

Die Beteiligung von Nek1 an der Homologen Rekombination

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Julian Spies

aus Aschaffenburg

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferentin: Prof. Dr. Christina Cardoso

Tag der Einreichung: 13.08.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2014

Darmstadt 2015

D17

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 13.08.2014

Julian Spies

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
VORWORT	XI
1 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 ERHALT DER GENOMISCHEN INTEGRITÄT	3
2.1.1 Die DNA-Schadensantwort.....	3
2.1.2 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	3
2.1.3 Die Homologe Rekombination.....	4
2.2 RAD54	11
2.2.1 Charakterisierung von Rad54.....	11
2.2.2 Funktionen von Rad54 während der HR.....	13
2.3 NEVER-IN-MITOSIS-KINASE RELATED KINASE A (NEK1)	15
2.3.1 Charakterisierung von Nek1.....	15
2.3.2 Beteiligung von Nek1 bei der DNA-Schadensantwort	17
2.4 ZIELSETZUNG.....	18
3 MATERIALIEN	19
3.1 RNA-INTERFERENZ	19
3.2 DNA-PLASMIDE	19
3.3 ENZYME	19
3.4 INHIBITOREN	19
3.5 ANTIKÖRPER	20
3.6 LÄNGENSTANDARDS	21
3.7 TRANSFEKTIONSREAGENZIEEN	21
3.8 CHEMIKALIEN	21
3.9 ZELLINIEN	22
3.10 LÖSUNGEN UND PUFFER	23
3.11 VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
3.12 GERÄTE.....	26
3.13 KITS	27
3.14 SOFTWARE	27
4 METHODEN.....	28
4.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	28
4.1.1 Passagieren von humanen Zelllinien.....	28
4.1.2 Aussaat von humanen Zelllinien in Zellkulturschalen	28
4.1.3 Transiente Transfektion von siRNA.....	29
4.1.4 Transfektion von DNA-Plasmiden.....	29
4.1.5 Herstellung von klonalen sh(<i>short-hairpin</i>)Nek1-Zelllinien.....	30
4.1.6 Induktion von DNA-Schäden	32

4.2	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	33
4.2.1	Fixierung der Zellen	33
4.2.2	Immunfluoreszenz- und EdU-Färbung.....	33
4.2.3	Zellzyklusphasen-spezifische Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen	34
4.3	<i>FLUORESCENCE-RECOVERY-AFTER-PHOTBLEACHING</i> (FRAP).....	35
4.3.1	Auswertung der FRAP-Experimente.....	36
4.4	ÜBERLEBENSEXPERIMENTE.....	36
4.4.1	Auswertung von Überlebensexperimenten.....	37
4.5	ZELLSYNCHRONISATION	37
4.6	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	38
4.7	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	38
4.7.1	Zellernte und Zelllyse.....	38
4.7.2	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	39
4.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
4.7.4	Western-Blot	40
4.7.5	Immunpräzipitation	41
4.7.6	Phosphatase-Assay	41
4.7.7	Kinase-Assay	42
4.8	CHROMOSOMALE STUDIEN	42
4.8.1	<i>Premature-Chromosome-Condensation</i> (PCC).....	42
4.8.2	Zellernte und Chromosomenpräparation.....	42
4.8.3	Auswertung der Chromosomenpräparate	43
5	ERGEBNISSE	44
5.1	GENOMISCHE INTEGRIÄT VON NEK1-DEFIZIENTEN ZELLEN.....	44
5.1.1	Einfluss von Nek1 auf die chromosomale Stabilität bei replikativem Stress.....	44
5.1.2	Einfluss von Nek1 auf das klonogene Überleben nach Behandlung mit S-Phase-schädigenden Agenzien.....	46
5.1.3	Die Rolle von Nek1 bei der DSB-Reparatur in der S-Phase.....	48
5.1.4	Die Rolle von Nek1 bei der DSB-Reparatur in der G2-Phase	51
5.1.5	Komplementationsstudien zur Nek1-abhängigen DSB-Reparatur in der G2-Phase	54
5.2	INTERAKTIONSSUDIEN ZWISCHEN NEK1, RAD51 UND RAD54.....	55
5.3	PHOSPHORYLIERUNGSSUDIEN VON RAD54	56
5.4	CHARAKTERISIERUNG VON RAD54-PHOSPHORYLIERUNGSMUTANTEN	58
5.4.1	DSB-Reparaturstudien in Rad54-Mutanten	58
5.4.2	Mobilitätsstudien mit Rad54-Mutanten.....	62
5.5	ZEITLICHER VERLAUF DER RAD54-PHOSPHORYLIERUNG	64
5.6	INTERAKTIONSSUDIEN ZWISCHEN RAD51 UND RAD54.....	67
5.7	INTERAKTIONSSUDIEN ZWISCHEN RAD54 UND RAD51 IN ABHÄNGIGKEIT DER PHOSPHORYLIERUNG VON RAD54 AM SER572.....	70
6	DISKUSSION	74
6.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE UND BESCHREIBUNG DES MODELLS	74
6.2	FUNKTION VON PHOSPHORYLIERTEM RAD54 BEI DER HR.....	77
6.2.1	Rolle der ATPase-Aktivität von phosphoryliertem Rad54 bei der Rad51-Dissoziation...	77
6.2.2	Vergleich der Rad54-Funktionen zu frühen und späten HR-Schritten.....	78
6.3	PHOSPHORYLIERUNGORT VON RAD54.....	80

6.3.1	Lokale Rad54-Phosphorylierung am DNA-Schadensort	80
6.3.2	Globale Rad54-Phosphorylierung im Zellkern	81
6.3.3	Phosphorylierung von Rad54 an den Zentrosomen.....	82
6.4	EINFLUSS VON NEK1 UND RAD54 AUF VERSCHIEDENE HR-PROZESSE.....	83
6.5	NEK1, KREBS UND KREBSTHERAPIE	85
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	87
8	ANHANG.....	98
8.1	LEBENS LAUF	98
8.2	TAGUNGSBEITRÄGE	99
8.3	EIGENBEITRÄGE UND FREMDBEITRÄGE	99
8.4	DANKSAGUNG.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der Homologen Rekombination nach dem Double-Holliday-Junction-Modell	6
Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der DSB-Endresektion	7
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Homologiesuche während der HR.....	9
Abbildung 2.4: Auflösung von doppelten <i>Holliday-Junctions</i>	11
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von Rad54A und dessen Paralog Rad54B	12
Abbildung 2.6: Entfernung von Rad51-Molekülen durch Rad54 von Heteroduplex-DNA	15
Abbildung 4.1: Exemplarische Zellzyklusverteilung nach DNA-Schädigung	35
Abbildung 5.1: Quantifizierung von Chromatidbrüchen in humanen, Nek1-defizienten Zellen nach replikativem Stress	45
Abbildung 5.2: Überlebenskurven nach MMS, MMC und Röntgenstrahlung in Nek1-defizienten Zellen.....	47
Abbildung 5.3: Reparatur von MMS-induzierten DSBs in der S-Phase.....	49
Abbildung 5.4: Reparatur von Röntgenstrahlen-induzierten DSBs in der G2-Phase	52
Abbildung 5.5: Komplementationsstudien mit Nek1-wt und Kinase-inaktivem Nek1-K33R	54
Abbildung 5.6: Immunpräzipitation von Nek1, Rad54 oder Rad51.....	56
Abbildung 5.7: Nek1 phosphoryliert Rad54 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	57
Abbildung 5.8: DNA-Schadensrekrutierung und DSB-Reparaturkapazität von Rad54-wt und Rad54-Mutanten	60
Abbildung 5.9: FRAP-Experimente zur Untersuchung der Mobilität von Rad54-Mutanten	63
Abbildung 5.10: Kinetik der Rad54-Phosphorylierung in der G2-Phase nach Röntgenbestrahlung	66
Abbildung 5.11: Interaktionsstudien von Rad51 und Rad54.....	68
Abbildung 5.12: Komplexbildung von Rad54 mit Rad51 in Abhängigkeit von Nek1	71
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Modells.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete siRNAs und die entsprechenden Sequenzen	19
Tabelle 4.1: Zellzahl und Volumen des Zellkulturmediums für verschieden große Zellkulturschalen	28
Tabelle 4.2: Eingesetztes Volumen von Zellkulturmedium ohne Zusatz, siRNA und HiPerFect für die siRNA-Transfektion von humanen Zelllinien	29
Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Transfektionsansätze	30
Tabelle 4.4: shRNA-Sequenzen zur Herunterregulierung von Nek1 und die shRNA-Sequenz für Kontrollzellen	31
Tabelle 4.5: Ausgesäte Anzahl von Zellen für die jeweiligen Zelllinien nach	37
Tabelle 4.6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	39
Tabelle 6.1: Übersicht aller Eigenschaften von Rad54-wt und den jeweiligen Mutanten.	75

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 binding protein 1
A	Alanin
aa	amino acid
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related
ATRIP	ATR-interacting protein
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BIR	break induced replication
BLM	Bloom's syndrome protein
BM	branch migration
bp	Basenpaar
BRCA1/2	Breast cancer type 1/2 susceptibility protein
BSA	bovine serum albumin
Cdc2	cell division control protein 2
CDK	cycline-dependent protein kinases
ChK	checkpoint kinase
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHJ	double-Holliday-Junction
D-Loop	displacement loop
DMC1	meiotic recombination protein
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNA2	DNA replication nuclease 2
DNAse	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxy-Uridin
Eme1	essential meiotic endonuclease 1
EXO1	Exonuklease 1
FACS	fluorecence activated cell sorting

FCS	Fetal calf serum
FKBP6	FK506 binding protein 6
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
<i>g</i>	Gravitationskonstante
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gen1	flap endonuclease GEN homolog 1
GFP	green fluorescent protein
Gy	Gray (Strahlendosis)
H2AX	Histon 2AX
H3	Histon 3
HelQ	helicase POLQ-like
HMG-I	high-mobility group I nonhistone protein
HR	Homologe Rekombination
hTert	human telomerase reverse transcriptase
HU	hydroxyurea
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IRIF	irradiation induced foci
K	Lysin
KE	Zellkernextrakte
kV	kilo Volt (Spannung)
mA	milli Ampere (Stromstärke)
Mcm2	minichromosome maintenance protein 2 homolog
MEM	minimal essential medium
MilliQ-Wasser	Reinstwasser
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
MRN-Komplex	MRE11-RAD50-NBS1-Komplex
Mus81	MMS and UV sensitive 81
NEAA	non-essential amino acids
Nek1	NIMA-related kinase 1
NHEJ	non-homologous end-joining
NIMA	never in mitosis gene A
NLS	nuclear localization signal
NS	non-silencing
PARI	PCNA-interacting protein

PBS	phosphate buffered saline
PCC	Premature-Chromosome-Condensation
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PE	plating Efficiency
PI	Propidiumiodid
PKD	polycystiv kidney disease
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidfluorid
Rad	radiation repair protein
RecA	recombinase A
RecQ5	DNA helicase Q5
RFC	replication factor C
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
ROI	region of interest
RPA	replication protein A
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SCE	sister chromatid exchange
SDS	sodiumdodecylsulfate
SDSA	synthesis dependent strand annealing
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	surviving fraction
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
SRPS	short rib polydactyly syndrome
ssDNA	single stranded DNA
T	Threonin
TopIII α	DNA-Topoisomerase 3 alpha
Unbeh.	unbehandelt
UV	ultraviolett
VDAC1	Voltage dependent Anion Channel 1
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
Wt	Wildtyp
λ -PP	λ -Phosphatase

Vorwort

Dieses Vorwort soll dem Leser helfen das Konzept der vorliegenden Arbeit leichter zu verstehen. Eine klassische Dissertation ist in naturwissenschaftlichen Fächern oftmals in Einleitung, Material & Methoden, Ergebnisteil und Diskussion gegliedert. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Grundkonzept ebenfalls beibehalten, wobei kleine Abweichungen vorgenommen wurden.

In der Sektion „Ergebnisse“ bauen die einzelnen Resultate stark aufeinander auf. Deshalb war es didaktisch sinnvoll einzelne Diskussionselemente bei den jeweiligen Ergebnissen einzugliedern, um somit ein besseres Verständnis für die darauf aufbauenden Experimente zu schaffen. In der Sektion „Diskussion“ werden abschließend alle Ergebnisse zusammengefasst und unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur miteinander zu einem Modell verknüpft. Das aufgestellte Modell wird mit bereits bestehenden Modellen detailliert verglichen, woraus sich zukünftige Fragestellungen und Perspektiven erschließen.

1 Zusammenfassung/Summary

Während der Evolution haben Organismen verschiedene Mechanismen entwickelt, um DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) effizient zu reparieren und somit ihre genomische Information bestmöglich zu bewahren. Die Homologe Rekombination (HR) stellt in humanen Zellen einen von zwei Hauptwegen zur Reparatur von DSBs dar. Das Grundprinzip der HR kann wie folgt zusammengefasst werden: Nach der Induktion von DSBs werden zunächst die DSB-Enden resektiert, wodurch einzelsträngige DNA-Bereiche entstehen. Diese einzelsträngige DNA wird daraufhin mit dem Protein Rad51 beladen, sodass sich ein Nukleoproteinfilament ausbildet. Dieses Filament sucht nach der komplementären DNA-Sequenz im Schwesterchromatid. Die gefundene homologe DNA-Sequenz wird schließlich als Vorlage genutzt, um die zerstörte oder resektierte DNA wieder neu zu synthetisieren. Um die DNA-Synthese initiieren zu können, müssen allerdings die zuvor beladenen Rad51-Moleküle von der DNA entfernt werden. Diese Dissoziation der Rad51-Moleküle wird von dem Protein Rad54 katalysiert, welches Rad51 kontroverserweise bereits bei frühen HR-Schritten assistiert und stabilisiert. Die Regulierung dieser gegensätzlichen Rad54-Funktionen sowie die Rad51-Dissoziation von der DNA sind bislang nur unzureichend verstanden.

Mit dieser Dissertation wurde ein Beitrag zum Verständnis der Regulierung von Rad54 bei der HR geleistet. Die Kinase Nek1 (*Never-in-mitosis A related protein kinase 1*) konnte hierbei als neuer HR-Faktor identifiziert werden, welcher die unterschiedlichen Funktionen von Rad54 reguliert. So wurde gezeigt, dass Rad54 von Nek1 am Serin572 phosphoryliert wird und dadurch die effiziente Reparatur von DSBs über HR ermöglicht. Diese Phosphorylierung von Rad54 findet erst zu späten Zeiten nach DNA-Schadensinduktion statt und zeitgleich wird die Bildung von stabilen Rad51/Rad54-Komplexen induziert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen besteht und folglich die Phosphorylierung am Serin572 die Bildung von stabilen Rad54/Rad51-Komplexen bewirkt. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass die Phosphorylierung von Rad54 die Rad51-Dissoziation zu späten HR-Schritten fördert. Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass phosphoryliertes Rad54 aufgrund seiner veränderten biochemischen Eigenschaften im Komplex zusammen mit Rad51 von der DNA dissoziiert. Nach erfolgter Dissoziation von Rad51 und Rad54 kann folglich die Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese eingeleitet und die HR erfolgreich beendet werden. Mit der Identifizierung der neuen Rad54-Phosphorylierungsstelle am Serin572 wurde also ein molekularer Schalter identifiziert, der es zum einen erlaubt, die unterschiedlichen Rad54-Funktionen während der HR zu erklären, und zum anderen die Regulation der Rad51-Dissoziation von der DNA beschreibt.

During evolution cells have developed efficient mechanisms to repair DNA double-strand breaks (DSBs) and thereby maintain genomic integrity. Homologous recombination (HR) is one of the two major repair pathways in mammalian cells. The initial step of HR involves DNA end-resection to generate single-stranded DNA (ssDNA) tails. Recruitment and binding of Rad51 to ssDNA allows strand invasion of the nucleoprotein filament into the homologous DNA sequence of the sister chromatid. Finally, during the process of recombination-associated DNA synthesis a DNA polymerase extends the 3' end of the invading strand. However, to allow recombination-associated DNA synthesis, Rad51 must be removed from the DNA. This process is predominantly catalyzed by Rad54, although Rad54 shares opposing functions at earlier steps of HR where it assists and stabilizes Rad51 on ssDNA. The removal of Rad51 from DNA is poorly understood and a potential regulatory mechanism for the contrary Rad54 functions during HR has not yet been described.

In this study the never-in-mitosis A related protein kinase 1 (Nek1) was identified as a novel regulator for Rad54 during HR. It was shown that Nek1 phosphorylates Rad54 at serine572 during late times after DNA damage induction. Simultaneously to this phosphorylation, the complex formation of Rad51 and Rad54 also arises at late stages of HR. Strikingly, both observations could be linked by showing that the phosphorylation of Rad54 at serine572 promotes the formation of stable Rad54/Rad51 complexes. Furthermore, the phosphorylation of Rad54 supports the removal of Rad51 from DNA. In conclusion, these data suggest a novel role for Nek1 during HR by phosphorylating Rad54, which then promotes its dissociation from the DNA in a complex together with Rad51. After removing Rad51 from the DNA, recombination-associated DNA synthesis can proceed to accomplish HR-mediated DSB repair. By identifying a novel Rad54 phosphorylation site on serine572, a molecular switch could be uncovered. The separation of the diverse functions of Rad54 allows a direct control of the Rad54 involvement during different steps of HR, including the dissociation of Rad51.

2 Einleitung

2.1 Erhalt der genomischen Integrität

Das Ziel eines jeden Lebewesens besteht darin seine genetische Information intakt an seine Nachkommen weiterzugeben. Die permanente Schädigung der DNA durch endogene sowie durch Umwelt-bedingte Faktoren kann die Erhaltung der genomischen Integrität gefährden. Es können vielfältigste Formen von DNA-Schäden in einer Zelle auftreten, wobei der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) den gefährlichsten DNA-Schaden darstellt (Jackson and Bartek, 2009). Ein einziger DSB kann zum Verlust von genomischer Information führen und dadurch Mutation hervorrufen, welche die Entstehung von Tumoren fördern. Um Tumorgenese zu vermeiden und die genomische Integrität zu gewährleisten, haben Zellen eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die man als DNA-Schadensantwort zusammenfassen kann (Lobrich and Jeggo, 2007).

2.1.1 Die DNA-Schadensantwort

Die Zelle ist in der Lage DNA-Schäden effizient zu detektieren und weitere Signalwege für den Erhalt der genomischen Integrität einzuleiten. Die Reparatur der DNA-Schäden ist hierbei von zentraler Bedeutung. Je nach DNA-Schaden und Zellzyklusphase werden Reparaturprozesse wie Nukleotidexzisionsreparatur, Basenexzisionsreparatur, Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR) eingeleitet (Branzei and Foiani, 2008; Ciccia and Elledge, 2010). Um zu vermeiden, dass Zellen mit beschädigten oder unvollständig replizierten Chromosomen in die Mitose progressieren können, wird die Progression der Zellen im Zellzyklus durch die Aktivierung von *Checkpoint*-Signalwegen arretiert. Solch eine Verzögerung in der Zellzyklusprogression ermöglicht die effiziente Reparatur von DNA-Schäden (de la Torre-Ruiz and Lowndes, 2000). Wenn irreparable DNA-Schäden auftreten, kann die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten, um somit den gesamten Zellverband bzw. den ganzen Organismus vor Mutationen und Tumorgenese zu schützen (Sancar et al., 2004). Die einzelnen Prozesse der DNA-Schadensantwort wie DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose sind eng miteinander verstrickt und eine Beeinträchtigung in schon einem dieser Wege führt zu genomischer Instabilität (Sancar et al., 2004).

2.1.2 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Nicht-homologe Endverknüpfung und die Homologe Rekombination stellen die beiden Hauptwege für die Reparatur von DSBs dar. Das NHEJ repräsentiert einen relativ schnellen Reparaturvorgang und ist während des gesamten Zellzyklus aktiv. Nach Röntgenbestrahlung wird die

Mehrheit aller induzierten DSBs über NHEJ (circa 80 %) repariert. Allerdings ist der Reparaturmechanismus fehlerbehaftet, da durch die Prozessierung der DSB-Enden genetische Information verloren gehen kann, oder die Verknüpfung von falschen DSB-Enden zur Entstehung von chromosomalen Abberationen, wie z. B. Translokationen führen kann (Branzei and Foiani, 2008; Pfeiffer et al., 2004; Riballo et al., 2004).

Der DSB-Reparaturvorgang der Homologen Rekombination ist dagegen relativ langsam und ist auf die späte S- sowie G2-Phase beschränkt, wenn homologe Schwesterchromatiden vorliegen. Dieser Reparaturweg verwendet die homologe Schwesterchromatide als Matrize für die Neusynthese der zuvor beschädigten DNA. Dieser Mechanismus kann ohne den Verlust von genetischer Information als fehlerfrei betrachtet werden, dennoch werden nach Röntgenbestrahlung nur circa 20 % der induzierten DSBs in der G2-Phase mittels HR repariert (Beucher et al., 2009; van Gent et al., 2001).

Neben der Zellzyklusphase ist auch die Art und der Ort des DNA-Schadens für die Wahl des DSB-Reparaturweges entscheidend. So werden komplexe DSBs, die etwa durch dicht-ionisierende Kohlenstoff-Ionen induziert werden, in der S- und G2-Phase präferentiell über den Reparaturweg der HR repariert (Shibata et al., 2011). Außerdem repräsentiert die HR einen Reparaturvorgang, der nach Röntgenbestrahlung in der G2-Phase hauptsächlich in heterochromatischer DNA stattfindet (Beucher et al., 2009).

2.1.3 Die Homologe Rekombination

Der generelle Mechanismus der Homologen Rekombination ist in Prokaryoten und Eukaryoten hochkonserviert (Krejci et al., 2012). Der Mechanismus findet sich nicht nur bei der Reparatur von exogen induzierten DSBs und *Interstrand-crosslinks* wieder, sondern spielt auch in der Mitose und bei der Reduktionsteilung in der Meiose eine zentrale Rolle (Heyer et al., 2010; Moynahan and Jasin, 2010). Die Homologe Rekombination ist ebenfalls essentiell für die Instandhaltung von Telomeren und die Aufrechterhaltung von Replikationsgabeln in der S-Phase (Lydeard et al., 2010). Die Beteiligung der HR an der Zellproliferation, der Zellteilung und DSB-Reparatur sichert folglich den Erhalt der genomischen Integrität und schützt einen Organismus vor Mutationen und Krebsentstehung (San Filippo et al., 2008).

2.1.3.1 Mechanismus der Homologen Rekombination

Die HR lässt sich nach dem *Double-Holliday-Junction*-(DHJ)-Modell in mehrere Einzelschritte gliedern. Nach Induktion eines DSB wird dieser zunächst resektiert, um einzelsträngige DNA (ssDNA) zu generieren. Es findet anschließend eine Homologiesuche und die Stranginvasion der ssDNA in eine homologe DNA-Sequenz statt, wobei sich ein sogenannter *Displacement Loop* (D-Loop) ausbildet. Unter Vorlage der homologen DNA-Sequenz findet DNA-Synthese statt und es bildet sich eine doppelte *Holliday-Junction* aus. Als letzter Schritt wird die DHJ wieder aufgelöst, wobei sich DNA-*Crossover*-Strukturen bilden können (San Filippo et al., 2008). In Abbildung 2.1 ist der Ablauf der HR schematisch dargestellt.

Neben dem *Double-Holliday-Junction*-Modell existieren auch noch weitere Subtypen von Homologer Rekombination. Man unterscheidet generell zwischen der *break-induced replication* (BIR), dem *synthesis-dependent strand-annealing* (SDSA) und dem *Double-Holliday-Junction*-Subweg. Alle drei Subwege basieren auf dem gleichen Prinzip der HR, nämlich Resektion des Bruchendes, Ausbildung eines D-Loops und Rekombinations-assoziiierter DNA-Synthese. Je nachdem welche Art von DNA-Schaden vorliegt und in welcher Entwicklungsphase oder Zellzyklusphase (Mitose, Meiose oder S-Phase) sich ein Organismus befindet, wird die Wahl des HR-spezifischen Subwegs beeinflusst (Heyer et al., 2010). In Abwesenheit des zweiten DSB-Endes ist beispielsweise BIR von besonderer Bedeutung. Solch ein Zustand kann in der S-Phase vorkommen, wenn Replikations-assoziierte, ein-endige DSBs entstehen. Als Besonderheit des BIR-Prozess ist zu erwähnen, dass nach der Ausbildung des D-Loops erneut eine vollständig ausgebildete Replikationsgabel entsteht, um DNA-Synthese erneut zu initiieren. (Lydeard et al., 2010; Symington and Gautier, 2011). SDSA und der DHJ-Weg benötigen hingegen das zweite Bruchende (Heyer et al., 2010). Beim SDSA bildet sich allerdings keine DHJ aus und somit entstehen auch keine *Crossover*-Strukturen, was das Potential für genomische Rearrangements reduziert (siehe Abbildung 2.1). Dieser HR-Unterweg spielt folglich im Gegensatz zum DHJ-Weg bei der Meiose nur eine Nebenrolle, dominiert jedoch in somatischen Zellen über den DHJ-Subweg (Chapman et al., 2012). Der DHJ-Subweg beschreibt den komplexesten bzw. umfassendsten HR-Mechanismus und wird deshalb repräsentativ statt der anderen HR-Subwege schrittweise erklärt:

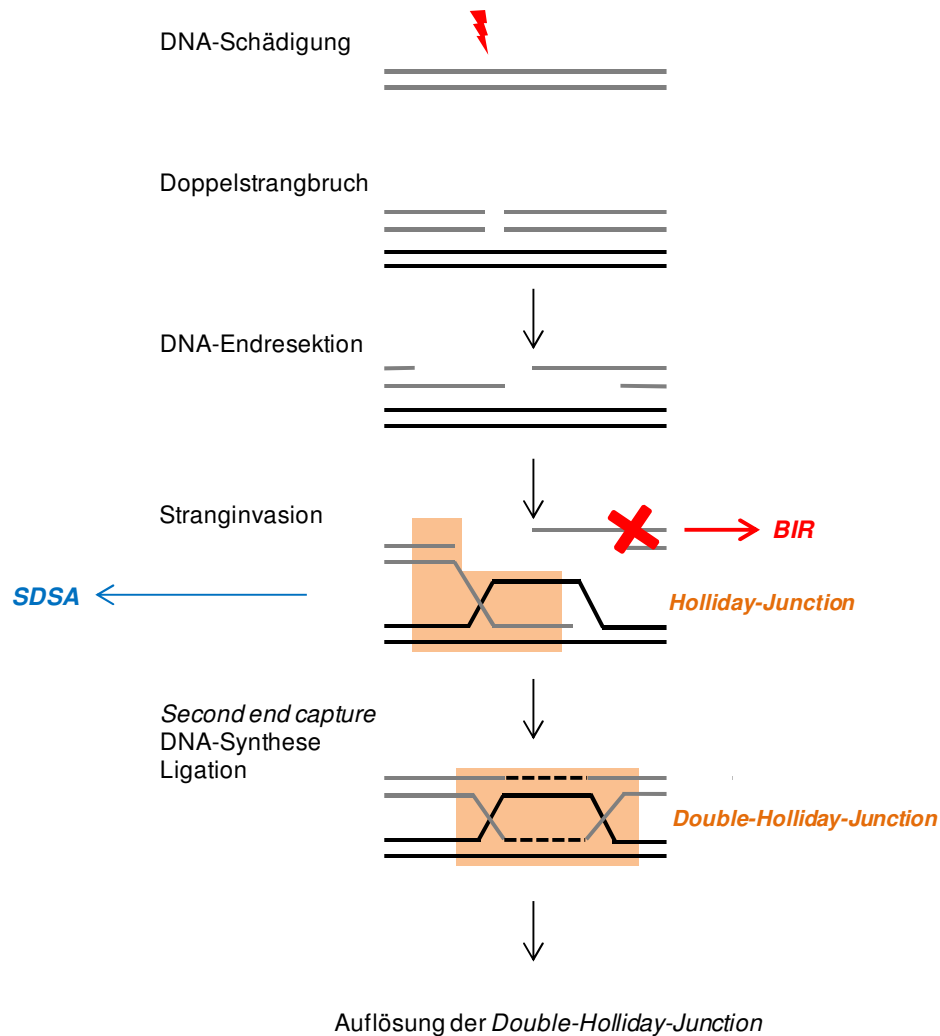


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der Homologen Rekombination nach dem *Double-Holliday-Junction*-Modell

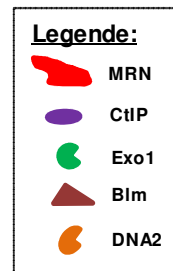
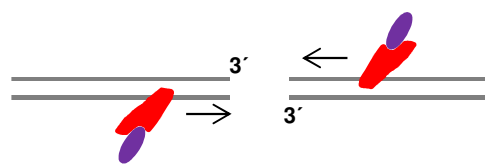
Nach DSB-Induktion werden die 5'-Enden des DSB um mehrere kB resektiert, um so ein geeignetes Substrat für die Homologiesuche zu generieren. Nach erfolgter Stranginvasion entsteht eine einfache *Holliday-Junction*. Wenn das zweite Strangende nicht zu Verfügung steht, kann der HR-Subweg BIR erfolgen. Steht das zweite DSB-Ende zur Verfügung, wird BIR unterdrückt und es kann Entweder der Subweg SDSA oder DHJ stattfinden. Bei beiden Subwegen hybridisiert das zweite DSB-Ende mit der homologen DNA des Schwesterchromatids (*Second end capture*). Beim DHJ-Subweg bilden sich im Gegensatz zum SDSA-Reparaturweg die namensgebenden doppelten *Holliday-Junctions* aus. Anschließend findet Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese statt und die doppelten *Holliday-Junctions* werden aufgelöst (frei nach Heyer et al., 2010).

DSB-Endresektion: Die Resektion der DSB-Enden ist der initiale Schritt der HR und reguliert gleichzeitig die Wahl des DSB-Reparaturweges zwischen HR und NHEJ, da resektierte DNA-Enden als Substrat für alle HR-abhängigen Reparaturwege benötigt werden und gleichzeitig die NHEJ-Effizienz vermindern (Longhese et al., 2010; Symington and Gautier, 2011). Wie in Abbildung 2.2 dargestellt ist, setzt sich die DNA-Endresektion aus zwei Teilschritten zusammen.

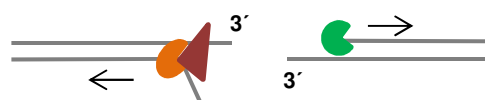
Die initiale Resektion in Säugetierzellen erfolgt durch Interaktion von CtIP und dem MRN-Komplex (Sartori et al., 2007). Zunächst wird durch dessen Endonuklease-Aktivität ein Einzelstrangbruch am 5'-DNA-Strang circa 300 Nukleotide vom Bruchende entfernt gesetzt, der dann in 3'-5'-Richtung prozessiert wird, sodass kurze einzelsträngige DNA-Bereiche entstehen (Garcia et al., 2011; Makharashvili et al., 2014; Symington and Gautier, 2011). Die Aktivität von CtIP wird an mehreren Phosphorylierungsstellen durch ATM und CDKs reguliert (Huertas and Jackson, 2009; Sartori et al., 2007).

Der zweite Schritt wird als *Long-Range-Resection* bezeichnet und umfasst die Resektion von mehreren tausend Basen. Diese Resektion wird in 5'-3'-Richtung von den Nukleasen DNA2 oder Exo1 katalysiert (Bolderson et al., 2010; Zhu et al., 2008). Für die DNA2-spezifische Resektion wird zusätzlich zu dieser Nuklease-Aktivität die Helikase-Funktion von BLM benötigt. Es sind zudem noch eine Reihe von weiteren Proteinen wie das Replikationsprotein A (RPA) und der MRN-Komplex an der *Long-Range-Resection* beteiligt (Nimonkar et al., 2011). Diese weitreichende Resektion ist notwendig, um in späteren Schritten der HR eine effiziente Homologiesuche zu ermöglichen.

1. Schritt der Resektion in 5'-Richtung



2. Schritt der Resektion in 3'-Richtung



Resultierende 3'-Überhänge

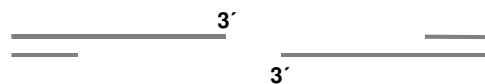


Abbildung 2.2: Schematischer Ablauf der DSB-Endresektion

Der erste Schritt der DSB-Endresektion beschreibt die CtIP/MRN-abhängige initiale Resektion in 5'-Richtung, die mehrere hundert Basen umfasst. In einem zweiten Schritt werden während der *Long-Range-Resection* mehrere tausend Basen in 3'-Richtung durch die Nukleasen Exo1 oder DNA2 entfernt. DNA2 interagiert bei diesem Prozess mit der Helikase BLM.

Bildung des Nukleoproteinfilamentes: Die durch Resektion erzeugten 3'-Überhänge bilden ein hoch affines Substrat für RPA. RPA-Moleküle binden an ssDNA und schützen diese vor Degradation durch Nukleasen und bilden zugleich eine Bindeplattform für andere Reparaturproteine wie z.B. ATR (ATM and Rad3 related) (Binz et al., 2004). Die Sensorkinase ATR wird durch RPA-beladene ssDNA aktiviert und fördert die Aktivität der *Checkpoint*-Kinase Chk1 (Shiotani and Zou, 2014). Chk1 reguliert wiederum BRCA2 (*Breast cancer type 2 susceptibility protein*) und Rad51, was zu einer Rekrutierung von Rad51 durch BRCA2 an die resektierten DNA-Bereiche führt (Sørensen et al., 2005; Ting and Lee, 2004; Yang et al., 2002). Neben BRCA2 sind viele andere DSB-Reparaturfaktoren wie HOP2-MND1, BLM, RecQ5 oder PARI an der Stabilisierung bzw. Destabilisierung von Rad51 an der einzelsträngigen DNA beteiligt (Branzei and Foiani, 2007; Bugreev et al., 2014; Moldovan et al., 2012; Srivastava et al., 2009). Die Proteinexpression von Rad51 in der gesamten Zelle sowie die exakte Regulierung am DNA-Schaden ist essentiell für die Zelle, da ansonsten toxische Rad51-Filamente das Zellüberleben gefährden (Shah et al., 2010; Tripathi et al., 2007). Der funktionale Komplex aus einzelsträngiger DNA und Rad51 ist von zentraler Bedeutung während der HR und wird als Nukleoproteinfilament bezeichnet.

Homologiesuche und Stranginvasion: Die Suche nach der homologen DNA-Sequenz auf dem Schwesterchromatid ist wohl der entscheidende, aber zugleich auch am wenigsten verstandene Schritt während der HR. Es ist allerdings bekannt, dass Rad51 (RecA in Prokaryoten) diesen Prozess entscheidend katalysiert (Baumann et al., 2014). Die meisten Experimente zur Aufklärung des Mechanismus der Homologiesuche wurden mit dem Rad51-Homolog RecA aus *E.coli* durchgeführt (Renkawitz et al., 2014). RecA besitzt zwei unterschiedliche DNA-Bindestellen (siehe Abbildung 2.3). Die primäre DNA-Bindestelle von RecA bindet an die resektierte DNA in einer Art und Weise, dass die einzelsträngige DNA um die 1,5-fache Länge gestreckt wird und dadurch die Basentriplets in einer B-DNA-förmigen Struktur angeordnet sind (Peacock-Villada et al., 2012). Die sekundäre Bindestelle ist für die homologe Sequenzsuche vorgesehen. Die unbeschädigte doppelsträngige DNA (dsDNA) des Schwesterchromatids kann allerdings nur gebunden und abgeglichen werden, wenn diese eine transiente dsDNA-Strangöffnung aufweist und somit ebenfalls einzelsträngig gebunden werden kann (siehe Abbildung 2.3). Um die Zugänglichkeit an der dsDNA zu erzeugen, könnte Rad54 mit seiner Chromatin-remodellierenden Funktion in Säugerzellen Rad51 assistieren (Renkawitz et al., 2014). An der sekundären DNA-Bindestelle wird die DNA ebenfalls durch die RecA-Bindung in ähnlicher Weise gestreckt wie an der primären DNA-Bindestelle.

Es wird davon ausgegangen, dass RecA mindestens 8 homologe Basenpaarungen für die Initiation der Stranginvasion benötigt. Nur wenn in einer Art Kettenreaktion weitere homologe Basen miteinander

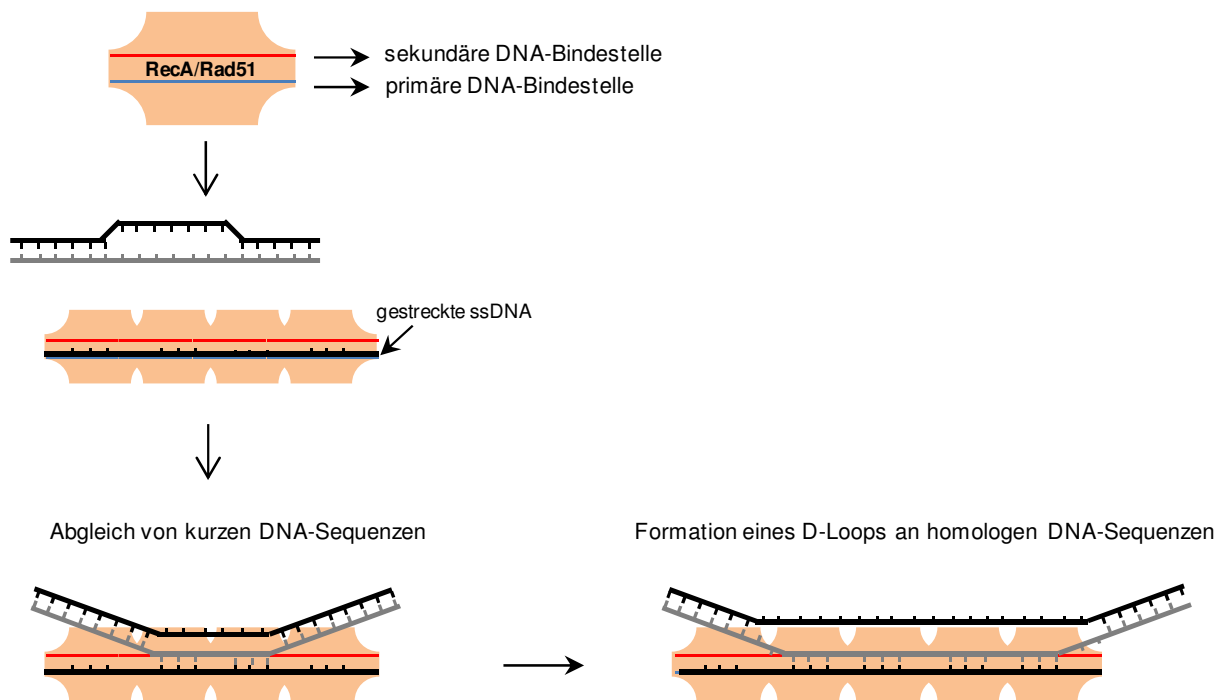


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Homologiesuche während der HR

RecA weist zwei DNA-bindende Domänen auf. Die primäre DNA-Bindestelle (blau) bindet resektierte ssDNA und streckt diese um das 1,5-Fache, sodass Basentriplets B-DNA-förmig angeordnet sind. Bei transienter Öffnung von dsDNA kann diese mit der resektierten ssDNA abgeglichen werden, indem ein Strang der dsDNA von RecA an der sekundären DNA-Bindestelle (rot) gebunden und in ähnlicher Weise wie die resektierte ssDNA gestreckt wird. Wird eine homologe DNA-Sequenz gebunden, entsteht ein D-Loop, der sich über mehrere hundert Basen erstreckt. (frei nach Renkawitz et al., 2014)

paaren (mindestens 500 - 1000 komplementäre Basen in Säugerzellen) kann ein stabiler intermediärer Komplex entstehen, der auch als D-Loop bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.3) (Renkawitz et al., 2014; Shulman et al., 1990). Während der Homologiesuche ist das Nukleoproteinfilament sehr mobil, da RecA durch seine ATPase-Funktion mit einer Geschwindigkeit von 8000 Basenpaaren/s (bp/s) an der dsDNA entlanggleiten kann, um dadurch einen möglichst großen Bereich der DNA abzusuchen (Ragunathan Cheng Ha, Taekjip, 2012). Generell wird davon ausgegangen, dass die RecA-vermittelte Homologiesuche eher ein zufälliges Abscannen von DNA im dreidimensionalen Raum als eine zielgerichtete Suche beschreibt (Forget and Kowalczykowski, 2012). Um die homologe DNA-Sequenz im dreidimensionalen Raum finden zu können, spielen desweiteren Cohesine, die Mobilität der Chromosomen sowie die gesamte nukleäre Organisation eine entscheidende Rolle. Diese Faktoren können somit den Prozess der Homologiesuche entscheidend katalysieren (Mine-Hattab and Rothstein, 2012).

Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese: Nach der Paarung von homologen DNA-Sequenzen müssen zunächst die an der Homologiesuche beteiligten Proteine wie Rad51 entfernt werden, bevor die Neusynthese von zerstörter oder verlorener DNA initiiert werden kann (Terasawa et al., 2007). An der Dissoziation von Rad51 ist neben Rad54 auch die Helicase HelQ beteiligt (Adelman et al., 2013; Ward et al., 2010). In *S. cerevisiae* wurden mehrere Faktoren des Replisoms identifiziert, welche während der Rekombinations-assoziierten DNA-Synthese involviert sind (Lydeard et al., 2010; Wang et al., 2004). So wird das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) von dem Replikationsfaktor C (RFC) auf den D-Loop beladen. PCNA initiiert wiederum die DNA-Synthese, indem es die Polymerase δ rekrutiert und stimuliert (Li et al., 2009; Li et al., 2013). Es wird desweiteren davon ausgegangen, dass weitere Polymerasen wie die Translesion-Polymerase η diesen Prozess stabilisieren und unterstützen (Sneeden et al., 2013).

Auflösung der Holliday-Strukturen: Vor 50 Jahren wurde von Robin Holliday das gleichnamige Model postuliert, welches den grundlegenden Mechanismus der DNA-Stranginvasion erklärt (Holliday, 1964). Einige Jahre später wurde bereits herausgefunden, dass die postulierten *Holliday*-Strukturen über *Resolution* oder *Dissolution* aufgelöst werden können, da entweder DNA-*Crossover*-Strukturen entstehen oder eben nicht (Matos and West, 2014). Erst rund 40 Jahre nach der Erstpublikation von Robin Holliday wurden die an der *Dissolution* beteiligten Proteine BLM und TopoIII α sowie die in die *Resolution* involvierten Nukleasen Mus81-Eme1 und Gen1 in humanen Zellen identifiziert (Liu and West, 2004). Während der *Dissolution* entwindet bzw. verschiebt die Helikase BLM, welche in einem Proteinkomplex mit der Topoisomerase TopoIII α vorliegt, doppelte *Holliday-Junctions*. Es entstehen bei diesem Prozess keine *Crossover*-Strukturen, da TopoIII α nur einen Einzelstrang der DNA schneidet (siehe Abbildung 2.4) (Karow et al., 2000; Wu and Hickson, 2003). Im Gegensatz dazu schneiden bei der *Resolution* die Nukleasen Gen1 oder Mus81-Eme1 Struktur-spezifisch doppelte *Holliday-Junctions* (Ip et al., 2008). Je nachdem in welcher Orientierung die DNA geschnitten wird, entstehen hierbei *Crossover*-Strukturen oder nicht (siehe Abbildung 2.4) (Matos and West, 2014). Die Zelle besitzt also eine gewisse Auswahl von Proteinen zur Auflösung von *Holliday*-Strukturen, die aber auch zu unterschiedlichen Endprodukten führen (*Crossover* vs. *Non-crossover*). Bis heute ist jedoch nicht verstanden, wie die Wahl der jeweiligen Proteine und damit der korrespondierende Weg reguliert und bestimmt wird (Matos and West, 2014).

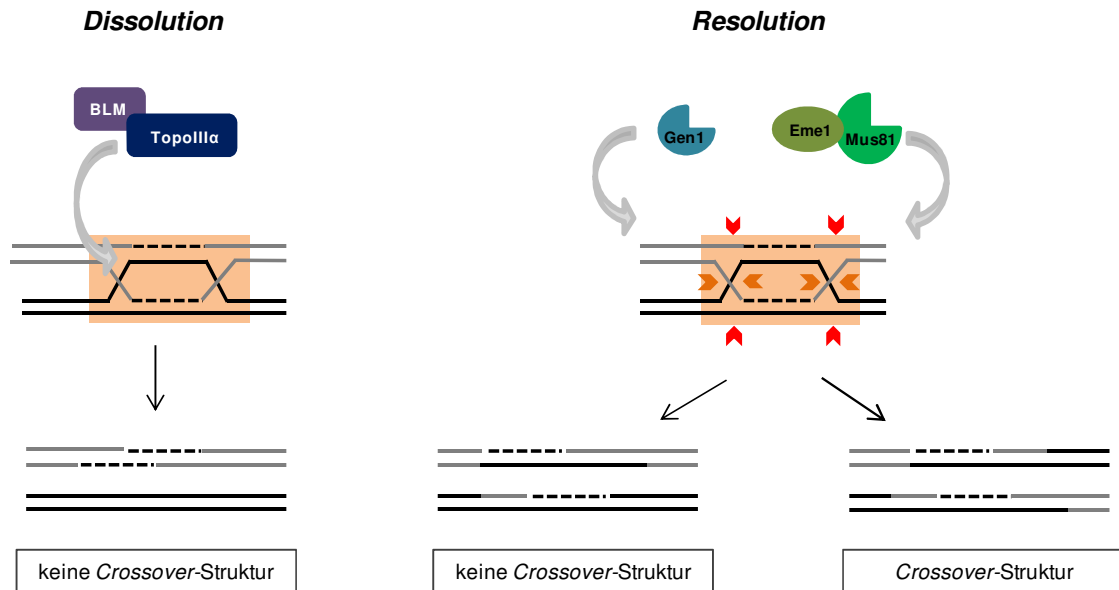


Abbildung 2.4: Auflösung von doppelten Holliday-Junctions

Unter der *Dissolution* von doppelten Holliday-Junctions versteht man die Entwindung oder Verschiebung von solchen Strukturen unter Beteiligung des Enzymkomplexes BLM/TopoIII α . Die DNA-Produkte der *Dissolution* weisen keine Crossover-Strukturen auf. Bei der *Resolution* schneiden spezifische Nukleasen wie Gen1 oder der Enzymkomplex Mus81-Eme1 in unterschiedlicher Orientierung (angedeutet durch orange oder rote Pfeile) an den doppelten Holliday-Junctions. Je nach Orientierung des Schnitts können Crossover-Strukturen entstehen oder nicht. (frei nach Matos und West, 2014)

2.2 Rad54

2.2.1 Charakterisierung von Rad54

Rad54 wurde als Mitglied der Rad52-Epistasiegruppe in *S. cerevisiae* identifiziert und ist in mehrere Prozesse während der HR involviert. Ebenso wie Rad52 und Rad51 bildet auch Rad54 IRIF (*irradiation-induced foci*) mit ähnlichen Kinetiken nach Bestrahlung aus. Während Rad51 in diesen dynamischen Foci relativ stabil assoziiert ist, zeigen Rad54 und Rad52 sehr kurze und reversible Interaktionen in diesen Strukturen (Essers et al., 2002).

Rad54 oder dessen Homologe kommen in allen erforschten Eukaryoten vor, jedoch sind keine Rad54-Homologe in Bakterien bekannt. In *S. cerevisiae* existiert neben scRad54 dessen Paralog scRdh54, welches ein überlappendes Funktionsspektrum aufweist. Im humanen System besteht neben Rad54 (Rad54A) das Paralog Rad54B, wobei dessen Hauptfunktion *in vivo* noch nicht genau verstanden ist (Ceballos and Heyer, 2011). Es ist aber bekannt, dass Rad54B wie sein Paralog Rad54A mit Rad51 interagieren kann. Desweiteren interagiert Rad54B auch mit dem Meiose-spezifischen

Rad51-Homolog DMC1 (Sarai et al., 2006, 2008). Es wird momentan davon ausgegangen, dass Rad54B ebenso wie Rad54A an Prozessen der HR beteiligt ist, wobei nicht exakt verstanden ist, in welcher Weise sich beide Proteine ergänzen oder etwa ersetzen können (Tanaka et al., 2000; Wesoly et al., 2006). Wie in Abbildung 2.5 zu erkennen ist, besitzen Rad54A und B jeweils 7 hochkonservierte ATPase-spezifische DNA-Sequenzen, welche in der SNF2-Domäne sowie der HelikaseC-Domäne lokalisiert sind und im gefalteten Protein die ATP-abhängige Motordomäne formen (Thomä et al., 2005). Diese ATPase-Funktion ist für viele Prozesse während der HR essentiell und ermöglicht eine ATP-abhängige Translokation von Rad54 entlang von dsDNA mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 300 bp/s (Amitani et al., 2006). Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass Rad54 evolutionär den Superfamilien von Helikasen der Klasse 2 (SF2) zuzuordnen ist, jedoch kann Rad54 keine klassische Helikasefunktion wie die Separierung von DNA-Strängen katalysieren (Mazin et al., 2010).

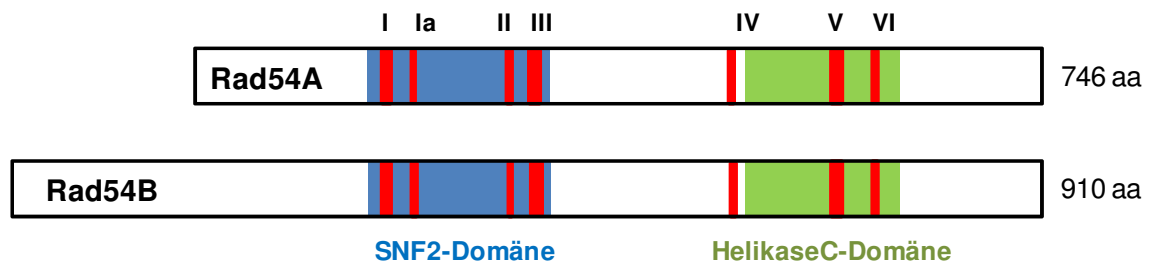


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung von Rad54A und dessen Paralog Rad54B

Beide Proteine weisen 7 charakteristische und hochkonservierte ATPase-Sequenzen auf, welche in der SNF2- und HelikaseC-Domäne eingebettet sind.

Die Beteiligung von Rad54 an der klassischen Reparatur von DSBs über Homologe Rekombination ist in vielen Arbeiten dokumentiert worden (Kim et al., 2002; Kirshner et al., 2009; Mills et al., 2004). Rad54 ist während der Reparatur von induzierten DSBs ein wichtiger Interaktionspartner von Rad51 und die Depletion einer dieser Faktoren führt zu einer unvollständigen HR und somit zu DSB-Reparaturdefekten (San Filippo et al., 2008). Es ist allerdings anzunehmen, dass Rad54 im Vergleich zu Rad51 eine verminderte Funktion bei HR-Prozessen in der Meiose sowie bei Replikations-assoziierten DNA-Schäden in der S-Phase aufweist (San Filippo et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass sich Rad54-Knock-Out-Mäuse relativ normal entwickeln, wohingegen der Verlust von Rad51 im Mausmodell embryonal letal ist (Essers et al., 1997). Ebenfalls wurde in *S. cerevisiae* nachgewiesen, dass Rad54-Mutanten im Gegensatz zu Rad51-Mutanten in der Lage sind lebensfähige meiotische Produkte zu bilden, während Rad54- und Rad51-Mutanten nach DNA-Schädigung eine ähnliche Sensitivität bzw. vergleichbare DSB-Reparaturdefekte aufweisen. Unterstützend für eine verminderte Bedeutung von Rad54 während der Meiose wurde zudem gezeigt,

dass der bevorzugte Ablauf von Rad54-abhängiger HR in *S. cerevisiae* intrachromosomal zwischen Schwesterchromatiden und nicht interchromosomal abläuft (Dronkert et al., 2000). Desweiteren ist zu vermuten, dass Rad54 bei gewissen Replikations-assoziierten HR-Prozessen im Vergleich zu Rad51 eine weniger essentielle Rolle spielt (Schlachter et al., 2011). Es wurde in mehreren Studien auf eine Rad54-abhängige und -unabhängige HR während der Instandhaltung von Replikationsgabeln hingewiesen, wobei all diese HR-Prozesse Rad51-abhängig sind (Eppink et al., 2011; Henry-Mowatt et al., 2003).

2.2.2 Funktionen von Rad54 während der HR

Rad54 ist an vielen Schritten der HR beteiligt, was in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt wurde. Bei fast all diesen Prozessen interagiert Rad54 N-terminal mit seinem Hauptinteraktionspartner Rad51 (Golub et al., 1997). Durch diese Interaktion stimulieren beide Proteine gegenseitig ihre motorische ATPase-Aktivität, welche für zahlreiche Prozesse entscheidend ist und die im folgenden genauer beschrieben wird (Heyer et al., 2006).

Homologiesuche: Rad51 und Rad54 werden mit ähnlichen Kinetiken an den resektierten DNA-Strang rekrutiert. Rad54 stabilisiert hierbei das Nukleoproteinfilament in einer ATP-unabhängigen Weise (Mazin et al., 2003). Aus Mäusezellen ist bekannt, dass die Rad54-abhängige Stabilisierung sogar Einfluss auf die Ausbildung der Rad51-Foci nimmt (Wolner et al., 2003). Dabei ist es lohnenswert zu erwähnen, dass die Interaktion von Rad54 und Rad51 in Eukaryoten Spezies-spezifisch ist und unterschiedliche Ausprägungen erreichen kann (Mazin et al., 2010). Durch die Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 wird ebenfalls die ATPase-Aktivität von Rad51 stimuliert, was essentiell für die Mobilität des Nukleoproteinfilamentes bei der Homologiesuche ist (Li et al., 2007; Renkawitz et al., 2014). Um erfolgreich homologe Sequenzen finden zu können, ist zusätzlich die transiente Remodellierung des *Template*-Stranges, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, notwendig.

Chromatin-Remodelling und Stranginvasion: Aus *in vitro*-Experimenten ist bekannt, dass Rad54 die Chromatinstruktur verändern kann, indem es Histone von der DNA entfernt (Alexeev et al., 2003; Zhang et al., 2007). Dieser Prozess ist *in vitro* von der ATPase-Aktivität von Rad54 abhängig. Diese Aktivität wird nicht etwa durch die beschriebene Rad54-Interaktion mit dem Histon H3 oder durch Bindung an Nukleosomen stimuliert, stattdessen wird die Rad54-Aktivität durch den Rad51-ssDNA-Komplex um ein Vielfaches verstärkt (Kwon et al., 2007). Durch diese Veränderung des Chromatinstatus wird die Stranginvasion bzw. Basenpaarung zwischen homologen Sequenzen erleichtert. Rad54 besitzt allerdings im Vergleich zu anderen Chromatin-Remodellierern eine vergleichsweise geringe Aktivität und es ist ebenfalls bekannt, dass in *S. cerevisiae* Rad51 den Prozess der Chromatinstrukturierung und Stranginvasion *in vivo* auch in Abwesenheit von Rad54

durchführen kann (Sugawara et al., 2003). Das vorherrschende Modell geht demnach davon aus, dass Rad54 *in vivo* für diese Prozesse nicht essentiell ist, diese aber katalysiert und Rad51 dabei assistiert (Ceballos and Heyer, 2011).

Branch Migration: Der Begriff *Branch Migration* (BM) beschreibt die Verschiebung oder Positionsänderung von *Holliday-Junctions*. *In vitro*-Studien konnten eine BM-Funktion von Rad54 nachweisen, wobei die Aktivität von Rad54 von speziellen DNA-Substraten und Rad51 in ATP-abhängiger Weise stimuliert wird (Bugreev et al., 2006, 2007). Momentan ist allerdings unklar, bei welchem Schritt der HR oder generell bei welchem Subweg der HR eine solche Rad54-abhängige BM-Funktion benötigt wird. Während der Rekombinations-assoziierten DNA-Synthese katalysiert Rad54 keine BM (Li et al., 2009). Stattdessen zeigt Rad54 *in vitro* eine BM-Funktion während der Regression von Replikationsgabeln, wobei sich DNA-*Chickenfoot*-Strukturen ausbilden können (Bugreev et al., 2011). Allerdings ist unklar, ob *in vivo* eine biologische Relevanz für diese Beobachtungen besteht. Neben Rad54 können *in vitro* weitere an der HR beteiligte Proteine wie BLM, WRN oder RecQ1 den Vorgang der BM katalysieren (Mazina et al., 2012).

Dissoziation von Rad51: Die unumstrittene Hauptfunktion von Rad54 ist das Ablösen von Rad51-Strukturen von der DNA. Nach erfolgter Stranginvasion liegt Rad51 immer noch gebunden an der Heteroduplex-DNA vor, besitzt aber keine weiteren Funktionen mehr. Um den nächsten Schritt während der HR, die Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese, beginnen zu können, muss allerdings Rad51 von der Heteroduplex-DNA entfernt werden (Terasawa et al., 2007). In *in vitro*-Experimenten wurde das ATP-abhängige Entfernen von Rad51 durch Rad54 nachgewiesen, denn durch die Bindung von Heteroduplex-DNA und die Interaktion mit Rad51 wird die ATPase-Aktivität von Rad54 und somit die Motorfunktion um ein Vielfaches verstärkt (Kiianitsa et al., 2002; Li et al., 2007; Solinger et al., 2002). Desweiteren wurde *in vitro* gezeigt, dass Rad54 das invasierende 3'-Strangende als Hexamer oder Dodecamer ummantelt, dass es durch seine Translokation entlang der Heteroduplex-DNA Rad51-Proteine von der DNA entfernt und dass es somit ein Rad51-freies Substrat für die Rekrutierung von DNA-Polymerasen generiert, um die DNA-Synthese zu erlauben (siehe Abbildung 2.6) (Amitani et al., 2006; Li and Heyer, 2009). Diese wichtige Funktion von Rad54 konnte auch in *in vivo*-Studien bestätigt werden. Rad54-defiziente Zellen weisen *in vivo* eine Akkumulation von Rad51-Foci auf, was darauf hindeutet, dass Rad51-Strukturen in Abwesenheit von Rad54 nicht effizient entfernt werden können (Kirshner et al., 2009; Wesoly et al., 2006). Desweiteren ist bekannt, dass Rad54 mit PCNA und Mus81 interagiert. Diese Interaktionen spiegeln die enge Vernetzung der Hauptfunktion von Rad54, die Entfernung von Rad51 von der Heteroduplex-DNA, mit anderen Prozessen wie Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese und Auflösung von *Holliday-Junctions* wider, bei denen PCNA und Mus81 beteiligt sind (Burgess et al., 2013; Mazina and Mazin, 2008).

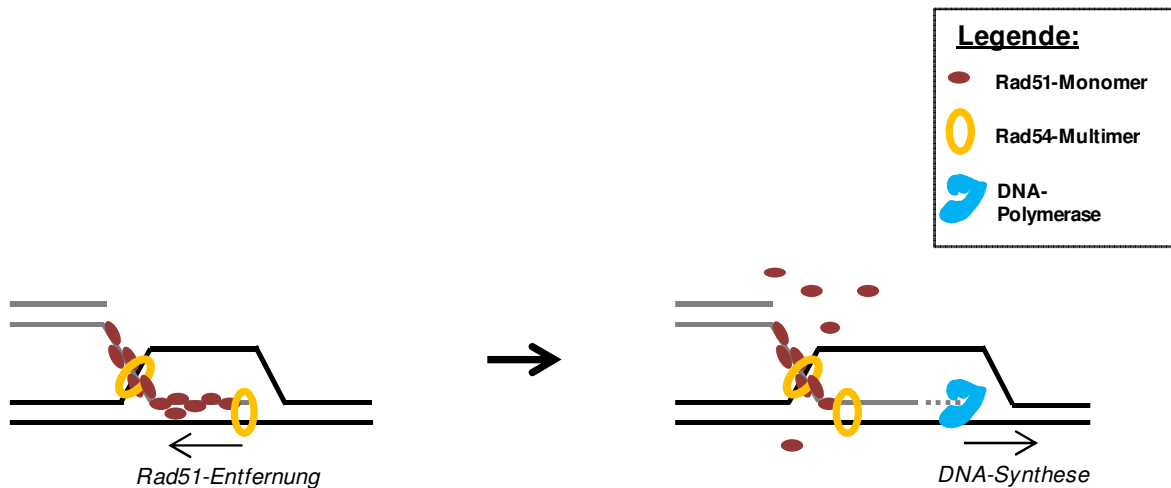


Abbildung 2.6: Entfernung von Rad51-Molekülen durch Rad54 von Heteroduplex-DNA

Ein Rad54-Multimer bindet am 3'-Strangende des invasierenden DNA-Stranges und wird durch spezifische Interaktion mit Rad51 und der Heteroduplex-DNA stimuliert. Die motorische ATPase-Funktion von Rad54 ermöglicht eine Translokation entlang der dsDNA und führt zur Demontage von Rad51. Die Rad51-freie Heteroduplex-DNA bildet eine geeignete Struktur, um die Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese durch Polymerasen zu initiieren. (frei nach Ceballos und Heyer, 2011)

Eine Regulierung von Rad54 bei der klassischen HR, also der Reparatur von DSBs, ist bislang nicht beschrieben. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass Rad54 während der HR ein stark reguliertes Protein verkörpert, da Rad54 teilweise gegenläufige Funktionen wie die Stabilisierung des Rad51-Filaments in frühen HR-Stadien und die Destabilisierung des Rad51-Filaments bei späten Schritten der HR katalysiert. Bislang wurde lediglich für den Prozess der meiotischen Rekombination eine Phosphorylierung von Rad54 durch die Kinase Mek1 (*S. cerevisiae*) nachgewiesen, welche zu einer verminderten Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 führt (Niu et al., 2009).

2.3 Never-in-mitosis-kinase related kinase A (Nek1)

2.3.1 Charakterisierung von Nek1

Das Gen NIMA (*Never-In Mitosis Gene A*) wurde erstmals in *Aspergillus nidulans* beschrieben. In diesem Organismus bewirkt dieser Faktor die Initiierung der Mitose, indem die Kondensation der Chromosomen durch die Phosphorylierung des Histon H3 induziert wird (De Souza et al., 2003). In *A. nidulans* existieren keine weiteren Paraloge von NIMA. In einigen parasitären, einzelligen Organismen wie z.B. *Giardia lamblia* besteht dagegen zwei Drittel des Kinoms aus NIMA-verwandten Kinasen, sodass diese Kinasefamilie eine zentrale Rolle in der zellulären

Organisation einnimmt (Manning et al., 2011). In Säugetieren existiert hingegen eine Familie von 11 Homologen des NIMA-Gens und diese werden als *Never-in-mitosis-kinase related kinase A* (Nek) 1 - 11 bezeichnet. Die Kinase-Domäne ist in allen 11 Familienmitgliedern hochkonserviert (Feige et al., 2006). Neben den Kinasefamilien Polo und Aurora stellt die Nek-Familie die dritte Gruppe der mitotischen Kinasen dar. Ein Großteil der Nek-Familienmitglieder ist in die Regulierung der mitotischen Teilung involviert. Neben der Zellteilung stellen die Regulierung von Cilien und die DNA-Schadensantwort zwei weitere Hauptfunktionen dar, an welchen diese Kinasen beteiligt sind (Meirelles et al., 2014). Viele der Nek-Familienmitglieder sind an Cilien/Zentrosomen lokalisiert, welche wiederum an der mitotischen Teilung und der DNA-Schadenantwort beteiligt sind (Hildebrandt and Otto, 2005).

Das Familienmitglied Nek1 ist für die Forschungsgemeinde besonders reizvoll geworden, als im Jahr 2000 interessante Phänotypen für Nek1-Mutanten im Mausmodell beobachtet wurden und als 2011 humane Syndrome mit Nek1-Defizienz beschrieben wurden (Thiel et al., 2011; Upadhy et al., 2000). Nek1-defiziente Mäuse weisen eine Zystenbildung in den Nieren auf, welche als *Polycystic kidney disease* (PKD) beschrieben wird (Upadhy et al., 2000). Desweiteren sind Nek1-defiziente Mäuse kleinwüchsig, weisen Gesichtsdysmorphismen, männliche Sterilität und eine geringe Lebenserwartung auf. Humane Nek1-Defizienz ist als embryonal letal beschrieben und aus Untersuchungen von Aborten weiß man, dass diese Patienten Symptome des *Short-Rib Polydactyly Syndrome Type Majewski* (SRPS) aufweisen (Thiel et al., 2011). Einige der beschriebenen Symptome sind verkürzte Rippen, Vielfingrigkeit, Nierenanomalien oder Hasenscharte. SRPS und PKD sind Syndrome, die auf Ciliendysfunktionen zurückzuführen sind (Yoder, 2007). So weisen Zellen von SRPS-Patienten verkürzte Cilien oder eine stark reduzierte Anzahl von Cilien auf. Diese Ciliopathien stehen im direkten Zusammenhang mit der Abwesenheit von Nek1, denn Nek1 lokalisiert in Wildtyp (wt)-Zellen an Cilien und ist für deren Ausbildung sowie deren Stabilität essentiell (White and Quarmby, 2008). Cilien stellen generell wichtige Organellen mit Funktionen bei der Zellteilung und in der Entwicklung von höheren Organismen dar (Nigg and Raff, 2014).

Die beobachteten Entwicklungsstörungen im Mausmodell und in humanen Patienten stehen ebenfalls im Einklang mit einer Beteiligung von Nek1 in der Meiose. Das Nek1-Protein zeigt in meiotischen Keimzellen im Vergleich zu anderen Geweben eine sehr hohe Expressionsrate. Desweiteren konnte eine Funktion von Nek1 während der Prozessierung von Kohäsion-assoziierten Proteinen in der Spermatogenese nachgewiesen werden (Holloway et al., 2011; Upadhy et al., 2000).

2.3.2 Beteiligung von Nek1 bei der DNA-Schadensantwort

Die drei wichtigsten Säulen der DNA-Schadensantwort bestehen aus Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose. Nek1 ist an jedem einzelnen dieser Prozesse beteiligt und stellt damit ein interessantes regulatorisches Protein für die Koordination dieser Prozesse dar.

In *S. cerevisiae* konnte bereits der Einfluss des NIMA-Homologs Kin3 auf die DNA-Schadensantwort mittels *colony forming assays* nachgewiesen werden. Kin3-Knock-Out-Zellen zeigen nach DNA-Schadensinduktion durch Methylmethansulfonat (MMS), Cisplatin oder UV-Strahlung eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu wt-Zellen (Moura et al., 2010). In murinen Zellen lokalisiert Nek1 im Cytoplasma und an Zentrosomen. Aufgrund des *nuclear localization signal* (NLS) transloziert Nek1 nach DNA-Schädigung in den Nukleus, ist dort in der Lage IRIF zu formen und lokalisiert somit an geschädigter DNA (Hilton et al., 2009; Polci et al., 2004). Ebenso wird die Proteinexpression von Nek1 nach ionisierender Strahlung hochreguliert und die Kinasefunktion aktiviert. Der Mechanismus der Nek1-Aktivierung ist weitestgehend unklar, aber aufgrund von charakteristischen Protein-Sequenzen des Nek1-Porteins, welche hohe Serin- und Threonin-Anteile aufweisen, wird von einer Autophosphorylierung ausgegangen (Surpili et al., 2003). Im folgenden Abschnitt soll die Beteiligung von Nek1 an den jeweiligen Wegen der DNA-Schadensantwort nach aktuellem Stand der Wissenschaft kurz dargestellt werden.

Zellzykluskontrolle: Nek1-defiziente Zellen können den G1/S- und den G2/M-Checkpoint nicht effizient aktivieren. Die Arretierung des Zellzyklus kann hierbei nicht initiiert werden, da die wichtigen Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2 nicht phosphoryliert und somit nicht aktiviert werden (Chen et al., 2008, 2011a; Pelegri et al., 2010). Diese Beobachtungen waren lange Zeit irritierend, da die Effektorinasen Chk1 und Chk2 eigentlich während des Checkpoint-Signalwegs Substrate der bekannten Sensorkinasen ATR oder ATM sind. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Nek1 die Kinase ATR phosphoryliert und somit die Komplexbildung von ATR mit ATRIP induziert. Ein funktionierender ATR/ATRIP-Komplex ist notwendig für die Phosphorylierung von Chk1 und somit für einen effizienten Zellzyklusarrest in G2/M (Liu et al., 2013).

Apoptose: Nek1 unterdrückt aktiv den programmierten Zelltod. Durch Nek1-abhängige Phosphorylierung des *Voltage dependent Anion Channel* (VDAC) bleibt dieser Kanal inaktiv und verhindert somit den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytoplasma. Der Ausstrom von Cytochrom C aktiviert Caspasen und ist ein wichtiger Schritt während der Initiierung der Apoptose (Chen et al., 2009, 2014). Durch Vitalitätstests konnte desweiteren bestätigt werden, dass Nek1 einen anti-apoptotischen Einfluss besitzt (Polci et al., 2004).

DSB-Reparatur: In Studien zur Nek1-abhängigen DNA-Schadensantwort konnte bereits gezeigt werden, dass Nek1-defiziente Zellen 24 h nach γ -Bestrahlung ein erhöhtes Niveau von DSBs im

Vergleich zu Kontrollzellen aufzeigten (Chen et al., 2008). Bestätigend konnte in weiteren Versuchen nach Schadensinduktion mit chemischen Agenzien mittels *Comet Assays* nachgewiesen werden, dass die DSB-Reparatur in Nek1-defizienten Zellen im Vergleich zu Nek1-profizienten Zellen verlangsamt oder ineffizient abläuft (Pelegrini et al., 2010).

2.4 Zielsetzung

Wie im vorausgegangenen Kapitel beschrieben wurde, ist Nek1 an der Reparatur von DSBs involviert. Bis heute wurde allerdings noch keine Beteiligung von Nek1 an einem spezifischen DSB-Reparaturweg identifiziert. Durch wichtige Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Löbrich konnte bereits der Grundstein für das Thema dieser Dissertation gelegt werden, indem eine Beteiligung von Nek1 bei der Homologen Rekombination vermutet wurde. Mittels Plasmid-basierter *Reporter Assays* und chromosomaler Analysen von *Sister Chromatid Exchanges* (SCE) konnte in Nek1-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine stark verminderte Frequenz der Homologen Rekombination detektiert werden.

Der Befund einer Nek1-Beteiligung bei der Homologen Rekombination sollte in der vorliegenden Arbeit mit einem erweiterten Methodenspektrum geprüft und verifiziert werden. Um die exakte Rolle von Nek1 bei der Homologen Rekombination definieren zu können, sollten desweiteren mittels biochemischer Methoden mögliche Interaktionspartner bzw. Substrate der Kinase Nek1 identifiziert und anschließend die Funktion dieser Interaktion analysiert werden. Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war es also, den molekularen Mechanismus zu analysieren, der einer Beteiligung von Nek1 während der Homologen Rekombination zugrunde liegt.

3 Materialien

3.1 RNA-Interferenz

Die in Tabelle 3.1 aufgeführten si(*small interfering*)RNAs wurden bei der Firma Qiagen erworben. Die beiden Nek1-siRNAs wurden auf der Qiagen homepage (www.qiagen.com) nach Eingabe der Gen-ID designt.

Tabelle 3.1: Verwendete siRNAs und die entsprechenden Sequenzen

siRNA	Sequenz	Stammlösung
Negativ Kontrolle (Ctrl)	5' AATTCTCCGAACGTGTCACGT 3'	20 µM
BRCA2	5' TTGGAGGAATATCGTAGGTAA 3'	20 µM
Nek1-1	5' GGAGAGAAGTTGCAGTATT 3'	20 µM
Nek1-2	5' GGGAAGCTATGCAGAATAA 3'	20 µM
Rad54	5' ACTCCCATCCAGAATGATT 3'	20 µM

3.2 DNA-Plasmide

Nek1-GFP wt:	pEGFP-Nek1-C1
Nek1-GFP K33A:	pEGFP-Nek1-C1 (Punktmutation Lys33 → Ala33)
GFP-Rad54 wt:	pEGFP-Rad54-N1
GFP-Rad54 S572A:	pEGFP-Rad54-N1 (Punktmutation Ser572 → Ala572)
GFP-Rad54 S572E:	pEGFP-Rad54-N1 (Punktmutation Ser572 → Glu572)
GFP-Rad54 K189R:	pEGFP-Rad54-N1 (Punktmutation Lys189 → Arg189)

3.3 Enzyme

RNaseA	Sigma-Aldrich
DNase I (D4527)	Sigma-Aldrich
Nek1 recombinant human protein (PV4202)	Life Technologies
λ-Phosphatase	New England Biolabs

3.4 Inhibitoren

Phosphatase-Inhibitoren

PhosSTOP®	Roche 10x in bidest.
Calyculin A	Calbiochem

Protease-Inhibitor

Complete®	Roche 25x in bidest.
-----------	----------------------

Inhibition der Polymerisation von Mikrotubuli

Nocodazol

Sigma-Aldrich

DNA-Polymerase-Inhibitor

Aphidicolin

Sigma-Aldrich

3.5 Antikörper

Primärantikörper

Rabbit Anti-BRCA2

(9012) (polyklonal IgG)

Cell Signaling

Mouse Anti-CyclinA

(CC17) (monoklonal IgG)

Calbiochem

Rabbit Anti-GAPDH

(sc-25778) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

Mouse Anti-GFP

(11814460001) (monoklonal IgG)

Roche

Rabbit Anti-GFP

(sc-8334) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

Normal goat IgG

(sc-2028) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

Normal mouse IgG

(sc-2025) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

Normal rabbit IgG

(sc-2027) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

Rabbit Anti-Nek1

(AP8072b) (polyklonal IgG)

Abgent

Rabbit Anti-Nek1

(custom made - PA5060) (polyklonal IgG)

ThermoFischer Scientific

Rabbit Anti-Nek1

(custom made - PA5061) (polyklonal IgG)

ThermoFischer Scientific

Mouse Anti-phospho-H3

(9706) (monoklonal IgG)

Cell Signaling

Mouse Anti-phospho-H2AX (Ser139)

(05-636) (monoklonal IgG)

Millipore

Rabbit Anti-phospho-H2AX (Ser139)

(2212-1) (monoklonal IgG)

Epitomics

Rabbit Anti-phospho-Rad54 (Ser572)

(custom made – PA6029) (polyklonal IgG)

ThermoFischer Scientific

Mouse Anti-Rad51

(ab213) (monoklonal IgG)

Abcam

Rabbit Anti-Rad51

(ab63801) (polyklonal IgG)

Abcam

Goat Anti-Rad54

(sc-5849) (polyklonal IgG)

Santa Cruz Biotechnology

<hr/>	
<u>Mouse Anti-Rad54</u> (sc-166370) (monoklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
<u>Rabbit Anti-tRFP</u> (AB233) (polyklonal IgG)	Evrogen
<u>Mouse Anti-αTubulin</u> (sc-8035) (monoklonal IgG)	Santa Cruz Biotechnology
 <u>Sekundäre Antikörper</u>	
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor488	Molecular Probes
Goat Anti-Mouse IgG-AlexaFluor594	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor488	Molecular Probes
Goat Anti-Rabbit IgG-AlexaFluor594	Molecular Probes
Chicken Anti-Goat IgG-AlexaFluor594	Molecular Probes
Donkey Anti-Goat IgG-AlexaFluor488	Molecular Probes
<hr/>	
3.6 Längenstandards	
PageRuler™ Plus Prestained Protein (SM1811)	Fermentas
ProSieve™ QuadColor™ Protein Marker (00193837)	Lonza
<hr/>	
3.7 Transfektionsreagenzien	
<u>siRNA-Transfektion</u> HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
<u>Plasmidtransfektion</u> MaTra-A Reagent	IBA
<hr/>	
3.8 Chemikalien	
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
APS	Roth
ATP	Roth
Bromphenolblau	USB
BSA (Immunfluoreszenz)	AppliChem
BSA (Western-Blot)	PAA
CaCl ₂	Roth
DAPI	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
Doxycycline hyclate	AppliChem
DSS	AppliChem

DTT	Roth
EDTA	Roth
Eisessig	Roth
FCS	Biochrom AG
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl	Roth
Hydroxy Urea	Sigma-Aldrich
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	Roth
Kristallviolett	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Fremma
Methanol	Roth
MgCl ₂	Roth
MMS	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Roth
NaCl	Roth
NaOH	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
NEAA	Biochrom AG
Puromycin	Merck Millipore
Rotiphere®Gel 30	Roth
SDS	Roth
TEMED	Roth
Thymidin	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
TritonX-100	Roth
Tween20	Roth

3.9 Zelllinien

HeLa-S3: HeLa-Zellen stammen aus einem Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) der Patientin Henrietta Lacks. Die Zelllinie HeLa-S3 ist ein Sub-Klon der HeLa-Zelllinie. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's *Minimal Essential Medium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) sowie mit 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA).

shNek1/ NS: sh(short hairpin)Nek1-Zellen sind HeLa-S3-Zellen, welche lentiviral mit pTRIPZ-shNek1 transduziert wurden. In diesen Zellen kann shNek1 Doxyzyklin-abhängig exprimiert werden, was zu einer Herunterregulierung von Nek1 führt. NS (*Non-silencing*)-Zellen exprimieren eine unspezifische shRNA-Sequenz und führen folglich zu keiner Herunterregulation von humanen Proteinen. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche shNek1-Zelllinien (shNek1-1 und shNek1-2) und eine NS-Zelllinie generiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's *Minimal Essential Medium* (DMEM) mit 10 % (FCS) und 1% NEAA.

<u>82-6hTert:</u>	82-6hTert-Zellen sind primäre humane Fibroblasten, welche durch genomische Integration eines h-Tert-Vektors (<i>human Telomerase reverse transcriptase</i>) immortalisiert wurden. Durch die Transformation der 82-6-Zellen mit dem h-Tert Gen wird die natürliche Verkürzung der Telomere verhindert, sodass 82-6hTert-Zellen über längere Zeit in Kultur gehalten werden können. Die Zellen wurden in <i>Minimal Essential Medium</i> Earle's (MEM Earle's) mit 20 % FCS sowie mit 1 % NEAA kultiviert.
<u>ErDa:</u>	ErDa (Erlangen-Darmstadt)-Zellen wurden erstmalig in der Veröffentlichung von Christian Thiel und Kollegen beschrieben (Thiel et al., 2011). Die von Patienten mit <i>Short-Rib Polydactyly Syndrom</i> stammenden Fibroblasten weisen eine genetische Nek1-Defizienz auf. Die Zellen wurden in Dulbecco's <i>Minimal Essential Medium</i> (DMEM) mit 20 % FCS und 1% NEAA kultiviert.
<u>HSF1:</u>	Bei HSF1-Zellen handelt es sich um humane Hautfibroblasten. Diese Wildtyp-Zellen wurden in <i>Minimal Essential Medium</i> Earle's (MEM Earle's) mit 20 % FCS sowie mit 1 % NEAA kultiviert.
<u>Hek293:</u>	Hek293 (<i>human embryonic kidney 293 cells</i>) sind humane embryonale Nierenzellen. In den 1970er Jahren wurden diese Zellen mit Adenovirus 5 DNA transformiert. Folglich haben die transformierten Hek-Zellen virale Gene integriert, welche für die Replikation und somit für die Produktion von bestimmten Retroviren essentiell sind. Die Kultivierung von Hek293-Zellen erfolgte in Dulbecco's <i>Minimal Essential Medium</i> (DMEM) mit 10 % FCS, sowie 1% NEAA.

3.10 Lösungen und Puffer

Die pH-Werte der jeweiligen Lösungen wurden mittels HCl bzw. NaOH eingestellt.

Zellkultur

PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4
Trypsin/EDTA:	0,5 M EDTA 2,5 % (v/v) Trypsin in PBS	pH 8

Zellaufschluss

Lysepuffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton 1 x PhosSTOP 1 x Complete	pH 8,2
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl 1% Triton 0.5% C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄ 150 mM NaCl 0.1% SDS 1 x PhosSTOP 1 x Complete	pH 8
NP-40-Puffer	10 mM Tris-HCl 10 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 30 mM Saccharose 0,5% NP-40 1 x PhosSTOP 1 x Complete	pH 6,8

SDS-Gel

Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris/HCl 0,2 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS	pH 8,8
5 x Laemmli-Probenpuffer	300 mM Tris/HCl 10 % SDS 25 % 2-Mercaptoethanol 50 % Glycerin 0,02 % Bromphenolblau	pH 6,8

Western-Blot

Transferpuffer:	20 mM Tris/HCl 150 mM Glycin 20 % Methanol	pH 8,3
TBS-T:	200 mM Tris/HCl 1,4 M NaCl 0,1 % Tween20	pH 7,6
Blockierlösung:	5 % Magermilchpulver in TBS-T	
Primärantikörperlösung/ Sekundärantikörperlösung:	1 % Magermilchpulver in TBS-T	

Antikörper-Crosslink

Waschpuffer:	20 mM Na ₂ HPO ₄	pH 7,5
Quenchingpuffer:	1 M Tris HCL	pH 7,5

Kinase-Assay

Kinasepuffer:	25 mM Tris 10 mM MgCl ₂ 0.5 mM EGTA 0.5 mM Na ₃ VO ₄ 2.5 mM DTT 0.01% Triton [®] X-100 200 µM ATP 1 x PhosSTOP 1 x Complete 10 ng/µl Nek1	pH 7,5
---------------	--	--------

Phosphatase-Assay

Phosphatase-Puffer:	1 x NEB-Puffer 1 mM MnCl ₂ 1 x Complete 10 U λ-Phosphatase/µl ad H ₂ O
---------------------	--

Immunfluoreszenz

Fixierlösung:	2,5 % Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung:	0,25 % TritonX-100 1 % FCS in PBS
Blockierlösung:	5 % BSA 1 % FCS in PBS
Waschlösung:	1 % FCS in PBS
DAPI-Lösung:	0,4 µg/ml DAPI in PBS

Überlebensexperimente

Kristallviolettlösung:	0,1 % Kristallviolett 25 % Methanol in bidest. H ₂ O
------------------------	---

Durchflusszytometrie

PI-Lösung:	0,1 mg/ml PI 10mg/ml RNase in PBS
------------	---

Chromosomenpräparation

Chromosomen-Fixativ :	Methanol : Eisessig = 3 : 1	
1x Sörensenpuffer:	67 mM KH ₂ PO ₄ 67 mM Na ₂ HPO ₄	pH 7,2
Giemsa-Färbelösung :	6 % Giemsa-Lösung in Sörensenpuffer	

3.11 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 15x15 mm	Roth
Dynabeads® Protein G	Life Technologies
Filterpapier, Whatman	Schleicher&Schüll
Küvetten (Kunststoff)	Roth
Objektträger superfrost	Roth
Parafilm	Roth
PVDF Transfermembran	ThermoFischer
Reaktionsgefäße SafeSeal 0,5 ml; 1,5ml; 2ml	Roth
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP
Zellkulturschaber	TPP
Zellkulturschalen 100x20 mm	Biochrom
Zellkulturschalen Nunclon 35x10 mm	VWR
Zellkulturschalen Nunclon 60x15 mm	VWR
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Neolab
µ-slide VI	Ibidi

3.12 Geräte

Chemilumineszenz- Cytomics FC 500	ChemiSmart 5000	Vilber Lourmat
Fluoreszenzmikroskope mit Kamerasystem	Axioplan2 Axioskop Axio Observer D	Beckman Coulter Zeiss Zeiss Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Inkubatoren	Axio Imager.M1 Hera cell 240 Heraeus	Zeiss ThermoScientific
Inversmikroskop (Zellkultur) Konvokalmikroskop	Eclipse TS100 Leica SP5II	Nikon Leica
Magnetrührer	Varimag®	H+P Labortechnik
Mikroliterpipetten		Gilson
pH-Meter	pMX2000	WTW
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra
Polyacrylamidgel-Elektro- phorese-Ausstattung	SE260	Hoefer
Power Supply		Pharmacia biotech



Röntgenröhre	MCN 165/796704	Philips
Spektralphotometer	Ultrospec 3000pro	Amersham
Sterilwerkbänke	Herasafe	Thermo scientific
Stickstofftank	Locator 8+	Thermolyne
Taumler	3011	GFL
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Tischschwenkplatte		Fröbel
Tischzentrifuge		neolab
Ultraschallgeräte	Sonorex	Bandelin
	Sonopuls	Bandelin
Vortex	genie2	Scientific industries
Waagen	TE1502S	Satorius
	TE153S-DS	
Western Blotting System	Mini Trans-Blot® Cell	BIO-RAD
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5804R	Eppendorf
	Centrifuge 5810R	
	Centrifuge 5415R	

3.13 Kits

TRIPZ Nek1 <i>Inducible shRNA Transfection Starter Kit</i> (RHS4741)	ThermoScientific
Click-iT™ <i>EdU Imaging Kit</i>	Invitrogen

3.14 Software

Sequenzanalysen	CLC Sequence Viewer	CLC bio
Dokumentation von Gelen	ChemiCapt	Vilber Lourmat
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	AxioVision 4.6.	Zeiss
	Metafer4	Metasystems
FRAP Experimente	LAS AF Lite	Leica
Quantifizierung von Proteinbanden/ Analyse von Chromosomen/ FRAP Auswertung	ImageJ	(Open source)
Lasersteuerung	PhoxX Controller	Omicron Laserage
Durchflusszytometrie-Analyse	CXP	Beckman Coulter
Steuerung Mikroskopisch	µManager	(Open Source)

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Passagieren von humanen Zelllinien

Die jeweiligen Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von ca. 90 % passagiert. Das alte Zellkulturmedium wurde zunächst abgesaugt, die Zellen wurden anschließend mit 10 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA versetzt. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte ca. 5 min bei 37°C und 5 % CO₂. Durch die Zugabe von Zellkulturmedium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde, je nach Zelllinie, in einem Verhältnis von 1:5 - 1:20 mit Zellkulturmedium verdünnt.

4.1.2 Aussaat von humanen Zelllinien in Zellkulturschalen

Je nach Versuch und Zelllinie wurden definierte Zellzahlen in unterschiedlich große Zellkulturflaschen ausgesät (Tabelle 4.1). Es wurden kleine (8,8 cm²), mittlere (21,5 cm²) und große (78,5 cm²) Zellkulturschalen verwendet, in die ein definiertes Volumen an Zellkulturmedium vorgelegt wurde. Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden vor der Aussaat der Zellen Deckgläschen in die Zellkulturschalen gelegt. Bis zur weiteren Behandlungen wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 4.1: Zellzahl und Volumen des Zellkulturmediums für verschieden große Zellkulturschalen

Zelllinien	8,8 cm ²	21,5 cm ²	78,5 cm ²
	Zellkulturschale	Zellkulturschale	Zellkulturschale
HeLa-S3	2-5 x 10 ⁵ in 2,2 ml	10 x 10 ⁵ in 5,5 ml	3 x 10 ⁶ in 10 ml
82-6hTert	5 x 10 ⁴ in 2,2 ml	1 x 10 ⁵ in 5,5 ml	
Hek293		4 x 10 ⁵ in 5,5 ml	1 x 10 ⁶ in 10 ml
HSF1	8 x 10 ⁴ in 2,2 ml	2 x 10 ⁵ in 5,5 ml	
ErDa	8 x 10 ⁴ in 2,2 ml	2 x 10 ⁵ in 5,5 ml	

4.1.3 Transiente Transfektion von siRNA

Die Transfektion von siRNA mittels „*HiPerfect Transfection Reagent*“ ist eine transiente Transfektion und somit nur von begrenzter Dauer. Das Prinzip des Einbringens der siRNA in die Zellen beruht auf der Ausbildung von DNA-Lipidkomplexen. Die Interaktion der siRNA mit der komplementären mRNA führt zu einer Suppression der gewünschten Proteinexpression.

Pro Transfektionsansatz wurden 25 nM siRNA zu einem definierten Volumen von reinem Zellkulturmedium (ohne Zusätze) gegeben. Anschließend wurde „*HiPerfect Transfection Reagent*“ beigelegt und der Ansatz für circa 1 min gevortext. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise und unter Schwenken der Zellkulturschale zu den zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Bis zur Ernte oder Fixierung der Zellen wurden diese zwischen 48 und 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion mit siRNA erfolgte unmittelbar nach der Aussaat der jeweiligen Zellen. In Tabelle 4.2 ist die Zusammensetzung der Transfektionsansätze für mittlere bzw. kleine Zellkulturschalen gezeigt.

Tabelle 4.2: Eingesetztes Volumen von Zellkulturmedium ohne Zusatz, siRNA und HiPerFect für die siRNA-Transfektion von humanen Zelllinien

	Medium	siRNA	Medium ohne Zusätze	HiPerFect
Kleine Schale (8,8 cm²)	ad 2,2 ml	3 µl (Stock 20 µM)	ad. 100 µl	12 µl
Mittlere Schale (21,5 cm²)	ad 5,5 ml	7,2 µl (Stock 20 µM)	ad. 240 µl	28,8 µl

4.1.4 Transfektion von DNA-Plasmiden

Die Transfektion von DNA-Plasmiden in adhärenente Zellen wurde mit der Methode der Magnet-assistierten Transfektion durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die jeweiligen DNA-Plasmide mit magnetischen Nanopartikeln einen Komplex ausbilden, welcher auf adhärenente Zellen getropft wird. Eine magnetische Unterlage bewirkt, dass die jeweiligen Komplexe aus DNA-Plasmiden und magnetischen Nanopartikeln in die Zellen eindringen.

Die Transfektion von Zellen mit DNA-Plasmiden wurde mit *MATra-A Reagent* durchgeführt. Hierfür wurde ein Transfektionsansatz aus einer definierten Menge von Plasmid-DNA, Zellkulturmedium (ohne Zusätze) und *MATra-A Reagent* hergestellt (Tabelle 4.3) und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz unter permanentem Schwenken der Zellkulturschale auf die Zellen getropft und die Zellkulturschale für 15 min auf einer magnetischen Unterlage bei 37°C und 5 % CO₂



inkubiert. HeLa-S3- oder Hek293-Zellen wurden 24 h zuvor ausgesät und mit siRNA transfiziert. Bis zur Ernte oder Fixierung wurden die Zellen für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Transfektionsansätze

	DNA	Medium ohne Zusätze	<i>MAtra-A Reagent</i>
Kleine Schale (8,8 cm ²)	3 µg	ad. 200 µl	3 µl
Mittlere Schale (21,5 cm ²)	7,5 µg	ad. 500 µl	7,5 µl

4.1.5 Herstellung von klonalen sh (*short-hairpin*) Nek1-Zelllinien

Zur Herstellung von Zelllinien mit induzierbarem Nek1-*knockdown*, wurde das „*TRIPZ inducible shRNA Transfection Starter Kit*“ von *Thermo Scientific Open Biosystems* verwendet. Der pTRIPZ Vektor wird dabei lentiviral appliziert und in der Zielzelle stabil integriert. Die generierte shRNAmir-Sequenz (microRNA-adapted shRNA) führt dann zur Herunterregulierung des gewünschten Proteins. Die Nek1-spezifischen shRNA-Sequenzen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Expression basiert auf dem sogenannten Tet-On Mechanismus, wobei die Protein-Depletion erst bei Zugabe von Doxzyklin erfolgt. Der verwendete pTRIPZ-Vektor enthält zudem ein turboRFP-Reportergen, was simultan zur shRNAmir Sequenz exprimiert wird und somit eine visuelle Kontrolle der Transfektionseffizienz darstellt. Eine weitere wichtige Eigenschaft dieses Vektors ist die Integration eines Resistenzmarkers für Puromycin, welcher die Selektion der transduzierten Zellen ermöglicht. Mit Hilfe eines Puromycin Toxizitätstests konnte die Zelllinien-abhängige Konzentration ermittelt werden, bei der Zellen nicht mehr in der Lage sind Kolonien zu bilden. Für HeLa-S3-Zellen ergab sich eine Konzentration von 0,2µg/ml. Die Herstellung der stabilen shNek1 Zelllinien lässt sich in folgende Schritte gliedern:

- Produktion der Lentiviren in Hek293-Zellen
- Virenernte
- Virale Transduktion von HeLa-S3-Zellen
- Selektion von transduzierter Zellen und Herstellung klonaler Zelllinien

Zur Virenproduktion wurden Hek293-Zellen mit einer Zellzahl von $5,5 \times 10^6$ in einer großen Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 Stunden wurde je ein Transfektionsansatz für den *Knockdown* von Nek1, sowie die *non-silencing* Kontrolle (NS) vorbereitet. Hierfür wurde eine Lösung aus 42 µg des pTRIPZ Vektors (shNek1/ shNS), 30 µl *Trans-Lentiviral Packaging Mix*, 105 µl CaCl₂ und ad 945 µl H₂O hergestellt. Zu dieser Lösung wurde unter ständigem Vortexen tropfenweise 1050 µl

2xHBSS-Lösung gegeben. Innerhalb einer 3-minütigen Inkubation entstand bei dieser CaPO₄-vermittelten Transfektion ein weißes Präzipitat. Das Gesamtvolumen wurde dann tropfenweise zu den Hek293-Zellen gegeben und diese für 10 - 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Calcium-Phosphat enthaltende Medium abgesaugt und mit Minimalmedium (*High Glucose* DMEM, 5 % FCS, 2mM L-Glutamin, 1x Penicillin/ Streptomycin) ersetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte die Virenernte erfolgen.

Das virenhaltige Medium wurde abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, um anschließend bei 1600 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde dann steril filtriert (0,45 µm Porengröße), in ein neues Gefäß überführt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

HeLa-S3-Zellen wurden am Tag vor der Transduktion in kleine Zellkulturschälchen mit einer Zellzahl von 4x10⁵ ausgesät. 24 h später wurde das Medium abgenommen und mit 3 ml des jeweiligen viralen Überstandes versehen. Nach weiteren 6 h wurde den Zellen zusätzlich 2 ml Vollmedium zugefügt und 72 h später konnte mit der Puromycin-Selektion begonnen werden. Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die transduzierten HeLa-S3-Zellen regelmäßig passagiert und permanent mit Puromycin behandelt.

Um Einzelzellklone der shNek1-Zellen herzustellen, wurde die Zellzahl bestimmt und eine Zelle pro *Well* in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden mittels Mikroskopie die jeweiligen *Wells* ermittelt, welche nur eine Zelle aufwiesen. Diese Zellen wurden bei entsprechender Konfluenz in größere Zellkulturgefäße passagiert und weiterhin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die jeweiligen Zelllinien wurden mit 2 µg/ml Doxzyklin versetzt um die Expression von shNek1 zu induzieren. Doxzyklin-haltiges Medium wurde jeden Tag ausgetauscht, da Doxzyklin in wässrigem Milieu eine Halbwertszeit von circa 24 h besitzt. Vor der Durchführung von Experimenten wurden die shNek1-Zelllinien mindestens für insgesamt 96 h mit Doxzyklin inkubiert. Die Herstellung der shNek1-Zelllinien ist in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt worden.

Tabelle 4.4: shRNA-Sequenzen zur Herunterregulierung von Nek1 und die shRNA-Sequenz für Kontrollzellen

shRNA	Antisense Sequenz
<i>Non-silencing</i>	CTTACTCTCGCCCAAGCGAGAG
shNek1-1	AATCTACGAAGTATTTCTC
shNek1-2	TAAATAATTGCTGTATTTC

4.1.6 Induktion von DNA-Schäden

4.1.6.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung wurde mit der Röntgenröhre Isovolt Titan E der Firma GE durchgeführt. Bei der Betriebseinstellung von 90 kV, 19 mA und einem Abstand von 30 cm zum Boden der Röntgenröhre, wurde eine Dosisleistung von 2,9786 Gy/min ermittelt. Zur Aufhärtung der Röntgenstrahlen wurde eine 1 mm dicke Aluminiumplatte mit einem Abstand von 30 cm zu der Röntgenröhre installiert. Unter Verwendung dieser Aluminiumplatte wurden sowohl Zellen auf Glas-Deckgläschen, als auch auf der Plastikoberfläche von Zellkulturschalen bestrahlt. Die applizierte Dosis, der auf Glas-Deckgläschen wachsenden Zellen, wurde durch einen Gewichtungsfaktor ≈ 2 korrigiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der durch Glas verursachte Gewichtungsfaktor in die Dosisangaben mit einberechnet.

4.1.6.2 Mikro-Laserbestrahlung

Für die Mikro-Laserbestrahlung wurden HeLa-S3-Zellen in kleine Zellkulturschalen ausgesät und für mindestens 24 h mit 50 μ M BrdU bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und in ein μ -slide VI (Ibidi) überführt (25.000 Zellen pro Kanal). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37° C und 5% CO₂, wurde das μ -slide VI in eine klimatisierte Kammer (37° C) eines Axio Observer D Mikroskops platziert. Für die Laser-Mikrobestrahlung bei 375 nm wurde ein Diodenlaser benutzt, welcher in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt und durch ein Phasenkontrast 3 Objektiv fokussiert wurde. Der Laser wurde von der Software Omicron PhoxX Controller gesteuert und bei einem Laser *Output* von 80 % verwendet. Der Mikroskoptisch wurde für die Laserbestrahlung von der Software μ Manager mit einer Geschwindigkeit von 0,201 mm/s automatisch gesteuert. Nach der Laserbestrahlung wurde das μ -slide VI bis zur Fixierung (3.2.1) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.1.6.3 Methylmethansulfonat (MMS) und Mitomycin C (MMC)

Um DNA mit MMS oder MMC gezielt zu schädigen, wurden die zuvor ausgesäten HeLa-S3-Zellen mit 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM oder 1,5 mM MMS bzw. mit 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml oder 1,5 μ g/ml MMC in Medium behandelt und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das MMS/MMC-haltige Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden wieder mit Medium bedeckt und bis zur weiteren Behandlung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2 Immunologische Methoden

Für immunologische Versuche wurden exponentiell wachsende Zellen auf Deckgläschen ausgesät, gegebenenfalls mit siRNA transfiziert, und nach entsprechender Inkubation bestrahlt oder mit MMS behandelt. Für eine Zellzyklusphasen-spezifische Analyse von DSB-Reparaturfoci ist eine Unterscheidung zwischen G1-, G2- und S-Phase-Zellen nötig. Für Reparaturstudien in der G2-Phase nach Röntgenbestrahlung wurden die Zellen 15 min vor dem Zeitpunkt der DNA-Schädigung mit 5 nM des Thymidinanalogons 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) und mit 100 µg/ml Nocodazol behandelt. Das Nukleotid EdU wird während der Replikation in die DNA inkorporiert und eignet sich somit zur Markierung von S-Phase-Zellen. Für Reparaturstudien in der S-Phase wurden die Zellen, parallel zur DNA-Schädigung durch MMS, für 1 h mit 5 nM EdU inkubiert.

4.2.1 Fixierung der Zellen

Nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeiten wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen durch eine 15-minütige Inkubation mit Fixierlösung bei RT fixiert. Anschließend wurde drei Mal für 10 min mit PBS bei RT gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran folgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C in Permeabilisierungslösung. Die Zellen wurden anschließend drei Mal jeweils 10 min in Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen bei Antikörper-Hybridisierungen zu vermeiden, wurden die Zellen für 30 min bei RT mit Blockierlösung behandelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die auf Deckgläschen fixierten Zellen bei 4°C in der Blockierlösung verwahrt.

4.2.2 Immunfluoreszenz- und EdU-Färbung

Die Untersuchung der DSB-Reparatur erfolgte durch die Kombinationen mehrerer Antikörper-vermittelter Färbungen. Nach der Fixierung der Zellen wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer überführt und mit 50 µl einer Primärantikörperlösung, bestehend aus zwei verschiedenen Antikörpern, überschichtet. Es wurden Antikörper gegen tRFP, GFP, γH2AX, Rad51 und Rad54 (mouse anti-GFP 1:1000; rabbit anti-RFP 1:2000; mouse anti-γH2AX 1:2000; rabbit anti-γH2AX 1:2000; rabbit anti-Rad51 1:15000; mouse anti-Rad51 1:2000; goat anti-Rad54 1:300) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen drei Mal jeweils 10 min mit PBS/1 % FCS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl einer Lösung von sekundären Antikörpern Alexa Fluor®488/ Alexa Fluor®594 (jeweils 1:1000 in PBS/1 % FCS) für 1 h bei Dunkelheit und RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS erfolgte die EdU-Färbung mittels „Click-iT™ EdU Imaging Kit“ nach Herstellerangaben. Die Deckgläschen wurden 30 min bei RT mit EdU-Färbelösung (Alexa

Fluor[®]647 konjugiert) inkubiert und anschließend 3 Mal mit PBS gewaschen. Die DNA der Zellkerne wurde für 4 min mit DAPI-Lösung bei RT inkubiert und abschließend wurden die Deckgläschen für 10 min mit PBS gewaschen. Zum Einbetten der Deckgläschen wurden diese mit 3 µl *Mounting-Medium* auf einen Objektträger gelegt und mit Nagellack versiegelt. Bis zur Auswertung wurden diese bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.2.3 Zellzyklusphasen-spezifische Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen

Um Reparaturkinetiken von Zellen in der S- oder G2-Phase erstellen zu können, wurde die Software *Metafer4* benutzt. Das Modul *Metacyte* dieser Software ist zunächst in der Lage Objektträger abzuscanen und einzelne Zellkerne aufgrund des DAPI-Signals zu erkennen. Die detektierten Zellkerne konnten durch die Quantifizierung des DAPI- und EdU-Signals in G1-, S- und G2-Phase-Zellen eingeteilt werden. Hierfür wurden die Intensitäten des DAPI- und EdU-Signals gemessen und gegeneinander aufgetragen. G2-Phase-Zellen besitzen aufgrund ihres doppelten DNA-Gehalts eine höhere DAPI-Intensität als G1-Phase-Zellen und können somit voneinander unterschieden werden. S-Phase-Zellen konnten EdU inkorporieren und durch die EdU-Färbung weisen diese Zellen ein EdU Signal auf, welches die S-Phase-Zellen von der G1- und G2-Population abhebt. Für DSB-Reparaturstudien in der S-Phase wurde eine EdU-Pulsbehandlung für 1 h durchgeführt. Alle Zellen, die sich während dieser Zeit in der S-Phase befanden oder in die S-Phase eingetreten sind, inkorporierten somit EdU und konnten angefärbt werden (Abbildung 4.1 A). Diese EdU-positiven Zellen wurden für die weitere Auswertung ausgewählt.

Für DSB-Reparaturstudien in der G2-Phase wurde eine EdU-Dauerbehandlung durchgeführt, sodass alle Zellen, welche während der Reparaturzeit in die S-Phase eingetreten sind, EdU-positiv waren. Für die weitere Auswertung wurden G2-Phase-Zellen ausgewählt, das heißt EdU-negative Zellen mit doppeltem DNA Gehalt (Abbildung 4.1 B).

Die ausgewählten S- oder G2-Phase-Zellen konnten über eine Relokalisierungsfunktion des Moduls *MetaCyte* angesteuert werden, um diese am Fluoreszenzmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung auszuwerten. Für jeden Reparaturzeitpunkt wurden, solange nicht anders gekennzeichnet, mindestens 40 Zellen ausgewertet und von den resultierenden Mittelwerten wurden die Kontrollen subtrahiert. Als Kontrollen wurden mindestens 40 unbehandelte Zellen (kein induzierter DNA-Schaden) ausgewertet.

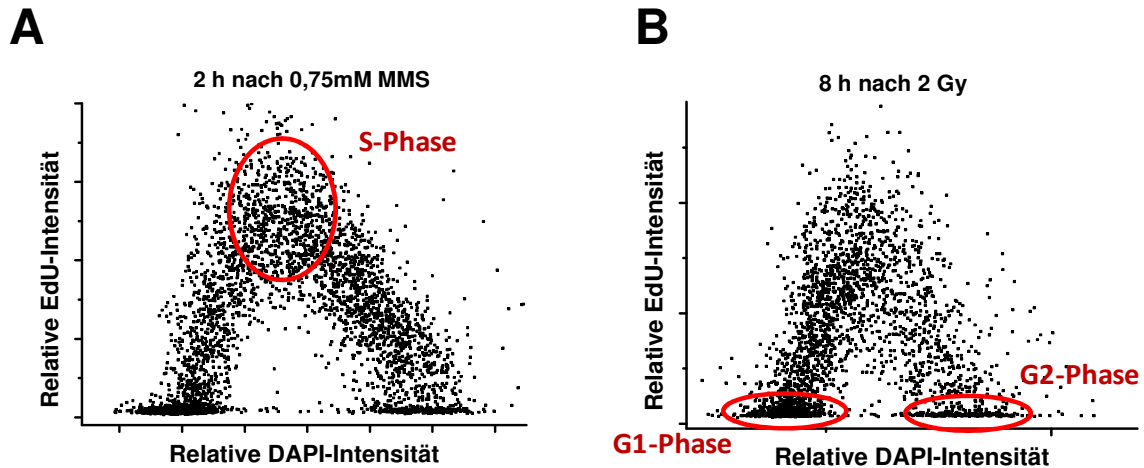


Abbildung 4.1: Exemplarische Zellzyklusverteilung nach DNA-Schädigung

(A) Zellzyklusverteilung 2 h nach MMS-Behandlung

(B) Zellzyklusverteilung 8 h nach Bestrahlung

DAPI- und EdU-Intensität wurden pro Zelle mit dem Modul *Metacyte* von *Metafer* gemessen. Alle eingescannten Zellen wurden in einem Diagramm angezeigt und anschließend Zellpopulationen Zellzyklusphasen-spezifisch ausgewählt (rote Kreise). Einzelne Zellen dieser Populationen wurden für die Auswertung relokalisiert.

4.3 ***Fluorescence-Recovery-After-Photobleaching (FRAP)***

Die Idee bei der Anwendung von FRAP-Experimenten besteht darin, die Verweildauer von fluoreszierenden Molekülen oder Proteinen an bestimmten Strukturen zu messen. Hierzu werden die Fluorophore in einer definierten Region mit einem Laser geeigneter Wellenlänge bestrahlt und somit ausgebleicht. Nun kann die Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität in der definierten Region über die Zeit gemessen werden. Das Fluoreszenzsignal rehabilitiert, da die ausgebleichten Fluorophore durch intakte Fluorophore ausgetauscht werden.

HeLa-S3-Zellen wurden in kleine Zellkulturschalen ausgesät, mit siRNA gegen Rad54 behandelt und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ mit GFP-Rad54-wt, GFP-Rad54-S572A, GFP-Rad54-S572E oder GFP-Rad54-K189R komplementiert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen in ein μ -slide VI mit circa 40.000 Zellen pro Kanal passagiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 4 Gy bestrahlt. 7 h später wurden die μ -slide VI in eine integrierte klimatisierte Kammer (37°C) eines Leica SP5II Konvokalmikroskops platziert. Die ausgebildeten GFP-Rad54-Foci wurden mit einem Argon-Laser (20 % der maximalen Laserintensität) ausgebleicht. Die Dauer des Ausbleichvorgangs wurde auf 500 ms festgesetzt, sodass die Fluoreszenzintensität des GFP-Rad54-Fokus auf circa 20-30 % reduziert wurde. Das Signal des Rad54-Fokus wurde mit einem 488 nm Laser (30 %, sichtbar) in 392 ms langen Abständen über insgesamt 55 Zyklen gescannt und detektiert. Die Aufzeichnung startete 5 Zyklen vor dem Ausbleichen und endete 50 Zyklen danach. Diese Experimente wurden automatisiert mit der Software

LAS AF Lite (FRAP WIZARD) durchgeführt. Ein FRAP-Experiment erstreckte sich jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde, sodass alle Rad54-Foci zwischen 7 und 8 h nach Bestrahlung ausgebleichen und vermessen wurden.

4.3.1 Auswertung der FRAP-Experimente

Um FRAP-Kurven von Rad54-Foci erstellen zu können, wurden die geblichenen Foci mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Der jeweilige Rad54-Fokus wurde als ROI 1 (*region of interest*) eingekreist und in unmittelbarer Nähe zu diesem wurde ebenfalls eine gleichgroße Referenzfläche in der Zelle als ROI 2 markiert. Die mittlere Intensität beider ROIs wurde für jeden einzelnen der 55 Messzeitpunkte (Zyklen) ermittelt. Die gemessenen Werte wurden in die unten dargestellte Formel (modifiziert nach Essers et al. 2002) eingesetzt.

$$FR_{spot}(t) = \frac{(I_{spot,t} - I_{spot,0})}{(I_{nuc,\infty} / I_{nuc,t<0}) \times (I_{spot,t<0} - I_{spot,0})}$$

$I_{spot,t}$ ist die Intensität des Rad54-Fokus beim jeweiligen Messzeitpunkt.

$I_{spot,0}$ entspricht der Intensität des Rad54-Fokus zum Zeitpunkt des Ausbleichens.

$I_{spot,t<0}$ ist der Mittelwert der Messwerte des Rad54-Fokus vor dem Ausbleichvorgang.

$I_{nuc,t<0}$ entspricht dem Mittelwert der Messwerte der Referenzfläche vor dem Ausbleichen.

$I_{nuc,\infty}$ entspricht dem Mittelwert der Messwerte der Referenzfläche bei den letzten 10 Messzeitpunkten.

4.4 Überlebensexperimente

Mit Hilfe von Überlebensexperimenten kann die Proliferationsfähigkeit und die reproduktive Integrität von Zellen nach DNA-Schädigung (Röntgenstrahlung, MMS- oder MMC-Behandlung) gemessen werden.

Die Zelllinien shNek1-1, shNek1-2 und NS wurden mindestens 96 h vor DNA Schadensinduktion bei 37°C und 5 % CO₂ kontinuierlich mit Doxyzyklin behandelt. Es wurde eine definierte Anzahl von Zellen pro Zelllinie und Dosis bzw. Konzentration in große Zellkulturschalen mit Doxyzyklin-haltigem Medium ausgesät (Tabelle 4.5). 12 h nach Aussaat der Zellen erfolgte die Schadensinduktion. Die Zellen wurden anschließend für 8-10 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit einer Kristallviolett-Lösung für 20 min bei RT fixiert und zugleich gefärbt. Danach wurde die Färbelösung abgegossen und die Zellkulturschale vorsichtig mit VE-Wasser mehrmals gespült. Nach anschließendem Trocknen wurde die Anzahl der Kolonien auf einem Leuchttisch per Auge bestimmt.

Tabelle 4.5: Ausgesäte Anzahl von Zellen für die jeweiligen Zelllinien nach entsprechender Schadensinduktion

	Zellzahl <i>Non-silencing</i> (NS)	Zellzahl shNek1-1/ shNek1-2
unbehandelt	100	200
5 Gy	100	800
10 Gy	600	4000
0.25 mM MMS	100	200
0,5 mM MMS	100	500
1 mM MMS	100	1000
0,5 µg/ml MMC	100	400
1 µg/ml MMC	200	1000
1,5 µg/ml MMC	400	2000

4.4.1 Auswertung von Überlebensexperimenten

Für die Auswertung der Überlebensexperimente wurde zunächst die *Plating Efficiency* (PE) von jeder Probe ermittelt. Die PE ergibt sich aus folgendem Verhältnis:

$$PE = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}} * 100$$

Um die *Surviving fraction* (SF) zu ermitteln wurde das Verhältnis der PEs von bestrahlten bzw. MMS-/MMC-behandelten Proben zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen ermittelt. Die SF-Werte wurden logarithmisch über die Dosis in ein Diagramm eingetragen. Die daraus resultierende Kurve bezeichnet man als Überlebenskurve.

4.5 Zellsynchronisation

Für die Synchronisation von Zellen in der G2-Phase wurde ein sogenannter doppelter Thymidinblock angewendet. Unphysiologisch hohe Konzentrationen des Nukleotids Thymidin (2 mM) bewirken eine Arretierung der Zellen in der frühen S-Phase, da die Replikation beeinträchtigt ist.

Zur Synchronisierung wurden exponentiell wachsende Zellen für 16 h mit 2 mM Thymidin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das thymidinreiche Medium wurde anschließend abgesaugt, der Zellrasen drei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit normalem Zellkulturmedium für 10 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin erneut für 14 h mit 2 mM Thymidin bei 37°C und 5 %

CO₂ inkubiert. Durch die wiederholte Thymidinbehandlung wurden die Zellen synchron in der frühen S-Phase arretiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und danach für 8 h bei 37°C und 5 % CO₂ mit normalem Zellkulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden dadurch aus dem frühen S-Phase-Arrest entlassen und konnten in die G2-Phase progressieren. Die Zellen wurden nun mit 10 Gy bestrahlt und nach den jeweiligen Reparaturzeiten geerntet (4.7.1).

4.6 Durchflusszytometrie

Exponentiell wachsende Zellen wurden mittels Trypsin-Behandlung geerntet und die Zellsuspension in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 10 min bei 400 x g und 4°C abzentrifugiert und das entstandene Pellet unter ständigem Vortexen tropfenweise mit eiskaltem 70%igem EtOH fixiert. Danach wurden die Zellen für mindestens 30 min bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden erneut 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit 0,5 ml PI-Lösung resuspendiert und für 30 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen wurde anhand des PI-Signals bei einer Emissionwellenlänge von 564-606 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) an einem Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) gemessen. Pro Probe wurden mindestens 15.000 einzelne Zellen erfasst und die Messungen wurden mit der Software CXP (Beckman Coulter) ausgewertet.

4.7 Proteinanalytische Methoden

4.7.1 Zellernte und Zelllyse

Nach den gewünschten Inkubationszeiten wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in ein Falcon überführt und 10 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Um Gesamtzellextrakte herzustellen wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes in RIPA-Puffer resuspendiert und zweimalig 10 Sekunden mittels Ultraschallstab sonifiziert. Um Zellkernextrakte (KE) herzustellen, wurden die Zellpellets zunächst mit NP40-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne 10 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden nun mit Lysepuffer resuspendiert und im Ultraschallbad sonifiziert. Die Lysate wurden anschließend für 30 min rotierend bei 4°C inkubiert. Die entstandenen Zelltrümmer wurden 30 min bei 16100 x g und 4°C abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis

zur weiteren Verwendung wurden die Gesamtzellextrakte/Zellkernextrakte bei -80°C aufbewahrt. Die Proben wurden während der einzelnen Arbeitsschritte stets auf Eis gelagert.

4.7.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Um die Proteinkonzentration der Zellextrakte zu bestimmen, wurde die Methode von Bradford angewandt. 1 µl Zellextrakt wurde zu einer Lösung aus 800 µl destilliertem Wasser und 200 µl Bradford-Reagenz pipettiert. Der Ansatz wurde ca. 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 590 nm photometrisch gemessen. Für die jeweiligen Zellextrakte wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Die durchschnittliche Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichkurve ermittelt.

4.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher Masse. Das Prinzip dieser Auftrennung beruht auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von Proteinen unterschiedlicher Größe im elektrischen Feld. Die Sekundärstruktur der Proteine hat keinen Einfluss auf die Auftrennung, denn die Proteine wurden zuvor denaturiert. Die eigene elektrische Ladung der Proteine ist vernachlässigbar, da sich negativ-geladenes SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) an die Proteine anlagert und zu einer konstanten negativen Ladungsverteilung aller Proteine führt. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele setzen sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen (Tabelle 4.6). Das Sammelgel dient der Akkumulation aller Proteine zu einer Laufront. Wenn die Laufront das Trenngel erreicht, werden die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Sammelgel (5 % Acrylamid)	Trenngel (10 % Acrylamid)
H₂O	2,25 ml	3,83 ml
Rotiphorese® Gel 30	0,55 ml	3 ml
Trenngel-Puffer	-	2,25 ml
Sammelgel-Puffer	0,95 ml	-
APS	25 µl	50 µl
TEMED	7 µl	5 µl

Die Polyacrylamid-Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Vor der Beladung der einzelnen Spuren mit Zellextrakten definierter Proteinmenge, wurden die Extrakte mit 5 x Lämmli-puffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Proteine wurden je nach Molekulargewicht zwischen 2 und 4 h bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA aufgetrennt.

4.7.4 Western-Blot

Unter dem Begriff Western-Blot versteht man die Übertragung von Proteinen von einem Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran. Die gewünschten Proteine können anschließend über spezifische Antikörperhybridisierungen detektiert werden.

Für den Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße) ist eine spezielle Anordnung im Blot-Tank erforderlich. Während des Zusammensetzens der einzelnen Lagen wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden und dass alle genannten Bestandteile zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurden. Die PVDF-Membran wurde vor der Äquilibration in Transferpuffer zusätzlich für 1 min bei RT in Methanol aktiviert. Die Blot-Apparatur wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Proteintransfer für 3 h bei 310 mA durchgeführt. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode und werden dabei auf die proteophile PVDF-Membran übertragen.

Nach der Übertragung der Proteine wurde die PVDF-Membran für 1 h bei RT in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in TBS-T wurde die Membran über Nacht in der jeweiligen Primärantikörper-Lösung (rabbit anti-GFP 1:1000; rabbit anti-BRCA2 1:1000; mouse anti-pH3 1:1000; rabbit anti-GAPDH 1:1000; mouse anti- α Tubulin 1:1000; rabbit anti-Rad51 1:1000; mouse anti-Rad51 1:1000; mouse anti-Rad54 1:400; rabbit anti-Nek1 1:500) bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in TBS-T erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat anti-mouse IgG-HRP 1:10.000, goat anti-rabbit IgG-HRP 1:30.000, donkey anti-goat IgG-HRP 1:10.000) bei RT. Die Membran wurde abschließend 3 Mal in TBS-T gewaschen und für die Detektion der Proteinbanden mit Luminol- und Enhancer-Lösung des „*Lumilight*“-Kits nach Herstellerangaben behandelt. An den sekundären Antikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase (*HRP* - *horseradish peroxidase*) gekoppelt, welche die Chemilumineszenzreaktion initiiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels *ChemiSmart5000*. Zur Aufbereitung und Quantifizierung der Proteinbanden wurde die Software *ImageJ* verwendet.

4.7.5 Immunpräzipitation

Das generelle Prinzip einer Immunpräzipitation besteht darin, dass ein bestimmtes Protein durch immunspezifische Wechselwirkungen aus einem Proteinlysat extrahiert werden kann. Hierfür wurden jeweils 4 µg spezifischer Antikörper (rabbit anti-Rad51, mouse anti-Rad51, goat anti-Rad54, rabbit anti-Nek1-PA5060, mouse anti-GFP) oder als Kontrolle unspezifische Antikörper (*normal rabbit IgG*, *normal mouse IgG* oder *normal rabbit IgG*) mit 25 µl Dynabeads™ Protein G in 600 µl PBS über Nacht, bei 4°C und unter ständiger Rotation inkubiert. Die Antikörper wurden danach über eine *Crosslink*-Reaktion kovalent an die Dynabeads™ gebunden, indem der Antikörper/Dynabeads™-Komplex 20 min bei RT in 400 µl Waschpuffer mit 1 ng/µl Disuccinimidyl Suberate (DSS) inkubiert wurde. Die Reaktion wurde mit *Quenching*-Puffer abgestoppt. Das permanente *crosslinken* von Antikörpern an Dynabeads™ wurde nur für die Experimente in Abbildung 5.6 durchgeführt.

Die Antikörper/Dynabeads™-Komplexe wurden mit einem Magneten separiert, eine definierte Menge des zuvor hergestellten Zellkernextraktes wurde zugegeben und über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Zellextrakte wurden zusätzlich mit DNase versetzt. Die Immunkomplexe wurden am nächsten Tag durch die magnetischen Dynabeads™ separiert und 4 Mal in Lysepuffer gewaschen. Um die präzipitierten Proteine auf ein SDS-Gel auftragen zu können, wurden die Dynabeads™/Immunkomplexe in Lämmli-puffer bei 95°C für 10 min aufgekocht. Dadurch wurden die präzipitierten Proteine von den Dynabeads™ gelöst und konnten dann mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert werden.

4.7.6 Phosphatase-Assay

Um die Proteine Rad51 und Rad54 *in vitro* zu dephosphorylieren wurden diese einer Phosphatasebehandlung unterzogen. Hierfür wurden zunächst endogene Rad51- oder Rad54-Proteine aus Gesamtzellextrakten von HeLa-S3-Zellen immunpräzipitiert. Diese Proteinkomplexe wurden durch die Antikörper-gekoppelten Dynabeads™ magnetisch separiert und dreifach mit PBS gewaschen. Die separierten Dynabeads™/Immunkomplexe wurden anschließend mit 100 µl Phosphatase-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Dynabeads™/Immunkomplexe drei Mal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend für 10 min in Lämmli-puffer bei 95°C aufgekocht. Die Antikörper/Dynabeads™-Komplexe wurden magnetisch entfernt und die präzipitierten Proteine konnten mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert werden.

4.7.7 Kinase-Assay

Um zu untersuchen ob Proteine *in vitro* von einer bestimmten Kinase phosphoryliert werden können, kann ein Kinase-Assay durchgeführt werden. Als Substrat für die Kinase Nek1 wurde GFP-Rad54-wt bzw. GFP-Rad54-S572A aus Gesamtzellextrakten von 48 h zuvor transient transfizierten Hek293-Zellen immunpräzipitiert. Nach abgeschlossener Immunpräzipitation wurden die Dynabeads™/Immunkomplexe drei Mal mit PBS gewaschen und die separierten Dynabeads™/Immunkomplexe anschließend mit 20 µl Kinasepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Dynabeads™/Immunkomplexe drei Mal mit Lysepuffer gewaschen und anschließend für 10 min in Lämmli-puffer bei 95°C aufgekocht. Die Antikörper/Dynabeads™-Komplexe wurden magnetisch entfernt und die präzipitierten GFP-Rad54-Proteine konnten nach SDS-PAGE und Western-Blot mit phospho-spezifischem Rad54-Antikörper auf Phosphorylierungssignale untersucht werden.

4.8 Chromosomale Studien

4.8.1 *Premature-Chromosome-Condensation* (PCC)

Die Methode der *Premature-Chromosome-Condensation* wird angewandt, um in Interphase-Zellen die verfrühte Kondensation ihrer Chromosomen zu erreichen, um diese mikroskopisch analysieren zu können.

ErDa- und HSF1-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden vor der Zellernte für 24 h mit 1 µM Hydroxyurea oder mit 0.2 µM Aphidicolin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um Chromosomen vor dem Eintritt in die Mitose zu kondensieren, wurden die Zellen vor der Zellernte für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ mit 50 ng/ml Calyculin A behandelt. Calyculin A inhibiert die Protein Phosphatase 1 und 2A und führt somit zur verfrühten Kondensation von Chromosomen. Nach der Behandlung mit Calyculin A wurden die Zellen geerntet und die Chromosomen präpariert.

4.8.2 Zellernte und Chromosomenpräparation

Da sich mitotische oder PCC-Zellen leicht abkugeln und sich somit vom Boden der Zellkulturschale lösen können, wurde das Zellkulturmedium vor der Zellernte abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, um somit alle mitotischen Zellen für die Metaphasenpräparation zu sammeln. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und 5 min bei 37°C und 5 % CO₂ mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde bis auf ca. 0,5 ml Restflüssigkeit abgesaugt, worin die Zellen resuspendiert wurden. Durch Zugabe von 10 ml, auf 37°C vorgewärmte 75 mM KCl-Lösung wurde ein Aufquellen der Zellen verursacht. Die Inkubation mit dieser hypertonischen Lösung erfolgte für 20 min bei 37°C. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 400 x g und 4°C sowie nach Absaugen der KCL-Lösung erfolgte die tropfenweise Zugabe von Fixativ unter ständigem Vortexen, bis ein Endvolumen von 10 ml erreicht wurde. Dieser Fixierungsschritt wurde anschließend zwei Mal wiederholt. Danach wurde die Zellsuspension für mindestens 1 h bei – 20°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 200 x g wurde der Überstand je nach Größe des Pellets bis auf 0,5 bis 1 ml abgenommen und die Zellen darin resuspendiert. 30 µl der Zellsuspension wurden auf einen angefeuchteten Objektträger getropft. Bei diesem Schritt platzten die Zellkerne der PCC-Zellen auf, so dass die Chromosomen gefärbt und analysiert werden konnten. Die Objektträger wurden anschließend für 10 min in 6 % Giemsa-Lösung inkubiert, um die DNA unspezifisch zu färben.

4.8.3 Auswertung der Chromosomenpräparate

Die Objektträger wurden am Durchlichtmikroskop mit dem Modul *MSearch* der Software *Metafer4* eingescannt. Ein 10 x Objektiv scannte einen ausgewählten Bereich des Objektträgers ab, erkannte einzelne Chromosomenspreitungen und speicherte die jeweiligen Koordinaten dieser Präparate. Ausgewählte Chromosomenspreitungen konnten über das *Metafer*-Modul *AutoCapt* wieder automatisch angesteuert werden um die Chromosomenpräparate mit einem 63 x Objektiv aufzunehmen. Die aufgenommen Bilder wurden mit der Software *ImageJ* bearbeitet und ausgewertet. Das Kontrastverhältnis wurde dabei so eingestellt, dass einzelne Chromatidbrüche sichtbar wurden. Die Anzahl der ausgewerteten Chromatidbrüche wurde auf einen vollständigen Chromosomensatz, also 46 Chromosomen normiert. Pro Experiment und Bedingung wurden mindestens 30 Chromosomenspreitungen ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Genomische Integrität von Nek1-defizienten Zellen

5.1.1 Einfluss von Nek1 auf die chromosomale Stabilität bei replikativem Stress

Das *Short-Rib Polydactyly Syndrome type majewski* (SRPS) ist auf eine Nek1-Defizienz im humanen Organismus zurückzuführen. Während der embryonalen Entwicklung führt diese Defizienz zur Letalität. In der Arbeitsgruppe um Dr. Christian Thiel (Universität Erlangen) wurden Biopsien von Aborten entnommen und davon Zellkulturen etabliert. Für die folgenden Experimente wurden diese humanen, homozygot Nek1-defizienten Hautfibroblasten (ErDa) mit Nek1-profizienten Wildtyp-Fibroblasten (HSF1) verglichen. Um diese Nek1-Defizienz auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mittels Western-Blot analysiert. Wie erwartet weisen ErDa-Zellen keine spezifische Nek1-Bande auf (Abbildung 5.1 A).

Um den Einfluss von Nek1 auf die chromosomale Stabilität zu untersuchen, wurden ErDa- und HSF1-Zellen für 23 Stunden mit 1 μ M Hydroxyurea (HU) oder 0,2 μ M Aphidicolin behandelt. Diese geringen Konzentrationen von HU oder Aphidicolin verursachen in der S-Phase replikativen Stress, was die Hemmung oder den Kollaps von Replikationsgabeln bewirken kann. Kollabierte Replikationsgabeln können wiederum zur Induktion von DSBs und somit auf chromosomaler Ebene zu Chromatidbrüchen führen. Um diese Chromatidbrüche analysieren zu können wurden die jeweiligen Zellen für 30 min mit Calyculin inkubiert, um somit eine vorzeitige Kondensation der Chromosomen einzuleiten (*Premature-Chromosome-Condensation*, PCC) (4.8.1 bis 4.8.3). Die frühzeitig kondensierten Chromosomen von HSF1- oder ErDa-Zellen wurden hinsichtlich des Auftretens von Chromatidbrüchen mikroskopisch analysiert.

Bereits in unbehandelten ErDa-Zellen treten circa drei Mal häufiger Chromatidbrüche auf als in unbehandelten HSF1-Zellen (Abbildung 5.1 B). Nach der Behandlung von Replikationsstress-verursachenden Agenzien steigt in ErDa-Zellen sowie in HSF1-Kontrollzellen das Level von Chromatidbrüchen im Vergleich zu unbehandelten Zellen an. Jedoch bleibt das Verhältnis an Chromatidbrüchen von HSF1- zu ErDa-Zellen nach induzierten Replikationsstress ähnlich wie in unbehandelten Zellen (HSF1:ErDa \approx 1:3).

Dieses Ergebnis lässt auf eine chromosomale Instabilität in Nek1-defizienten ErDa-Zellen nach replikativem Stress schließen und weist auf eine Beteiligung von Nek1 bei der Tolerierung von replikativem Stress hin. Es ist bereits bekannt, dass während des Auftretens von Replikationsstress (Hemmung der Replikationsgabeln) HR-Prozesse für die Stabilisierung der Replikationsgabeln bzw. für *Restart*-Mechanismen benötigt werden (Zhang, 2013). Außerdem können beim Kollaps der Replikationsgabeln DSBs entstehen, die ebenfalls einer HR-spezifischen Reparatur unterliegen (Carr

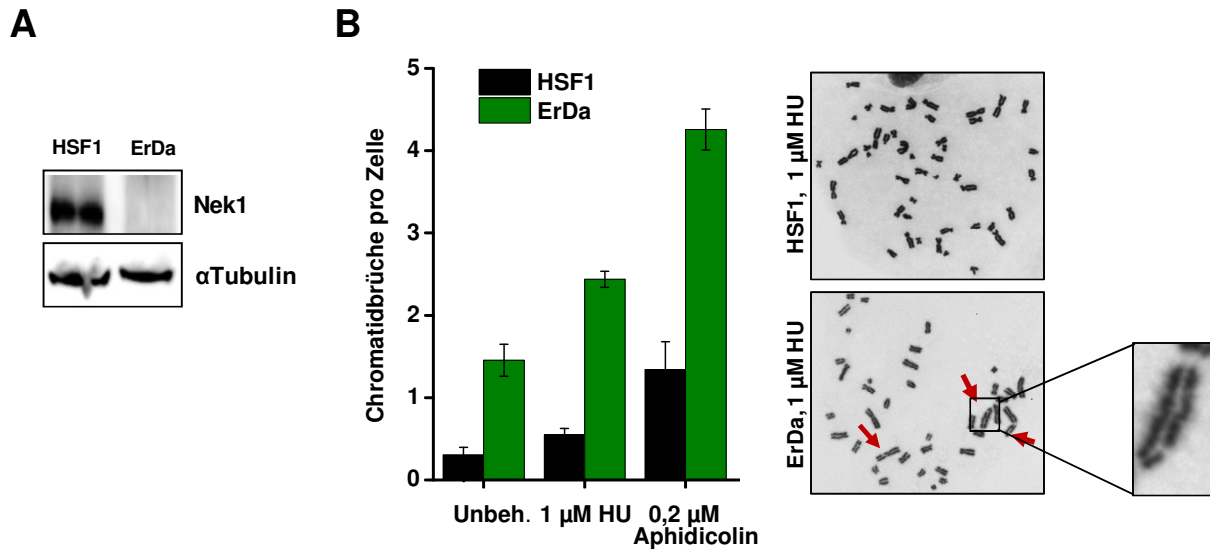


Abbildung 5.1: Quantifizierung von Chromatidbrüchen in humanen, Nek1-defizienten Zellen nach replikativem Stress

- (A) Proteinanalyse von Nek1 in Nek1-profizienten (HSF1) und Nek1-defizienten (ErDa) Hautfibroblasten mittels Western-Blot.
- (B) Chromosomale Analysen von HSF1- oder ErDa-Zellen nach 24-stündiger HU-, Aphidicolin-Behandlung oder unbehandelt (Unbeh.). Chromosomen wurden mittels PCC vorzeitig kondensiert und auftretende Chromatidbrüche wurden nach Chromosomenpräparation mikroskopisch detektiert und quantifiziert. Aus einer Chromosomenspreitung von HU-behandelten HSF1- oder ErDa-Zellen ist repräsentativ ein Chromatidbruch 630-fach vergrößert dargestellt. Die roten Pfeile zeigen weitere Chromatidbrüche an. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte.

and Lambert, 2013). Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass in Nek1-defizienten Zellen nach Replikationsstress vermehrt Chromatidbrüche auftreten, lassen vermuten, dass Nek1 bei HR-Prozessen zur Bewältigung von Replikationsstress involviert ist.

Auffällig ist, dass auch in den unbehandelten ErDa-Zellen eine höhere Chromatidbruchrate als in unbehandelten Wildtypzellen nachzuweisen ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass auch in unbehandelten Zellen während der S-Phase Replikationsstress auftritt, der durch beispielsweise endogen verursachte Basenschäden induziert werden kann (Clancy, 2008). Die Behandlung der Zellen mit HU oder Aphidicolin verursacht folglich zusätzlichen Replikationsstress, der sich zwar auf Ebene der Chromatidbrüche widerspiegelt, aber nichts am Verhältnis der Chromatidbruchrate HSF1 zu ErDa ändert. Unterstützend für eine Funktion von Nek1 bei der Tolerierung von Replikationsstress ist die beschriebene Rolle des Nek1-Paralogs Nek8. Nek8 ist dafür bekannt an Replikationsgabeln zu binden, um deren Stabilisierung an der DNA zu unterstützen. Eine Destabilisierung von Replikationsgabeln durch Nek8-Defizienz führt in unbehandelten S-Phase-Zellen zu einem deutlich erhöhten Level von spontanen DSBs (Choi et al., 2013). Daher ist es möglich, dass auch Nek1 sowohl bei der

Stabilisierung von Replikationsgabeln als auch bei der Reparatur von Replikationsstress-assoziierten DSBs eine wichtige Rolle spielt.

5.1.2 Einfluss von Nek1 auf das klonogene Überleben nach Behandlung mit S-Phase-schädigenden Agenzien

Da im vorausgegangenen Kapitel eine Funktion von Nek1 bei auftretendem Replikationsstress in der S-Phase gezeigt werden konnte, soll nun der Einfluss von Nek1 beim klonogenen Überleben nach der Behandlung von S-Phase-schädigenden Agenzien untersucht werden. Für die Durchführung von Überlebensexperimenten in Abhängigkeit von Nek1 wurden induzierbare, klonale sh(*short-hairpin*)Nek1-Zellen hergestellt (siehe 4.1.5). Das Prinzip von shRNA-Techniken beruht auf der RNA-Interferenz. Ein Nek1-spezifisches shRNA-Plasmid (shNek1) wurde in HeLa-S3-Zellen stabil integriert. Die Transkription dieser shNek1-Sequenz wird durch Doxzyklin induziert und führt zum Abbau der endogenen Nek1-mRNA und somit zur Herunterregulation des Nek1-Proteinlevels. Um eine effiziente Nek1-Herunterregulation zu erreichen wurden shNek1-Klone für 4 Tage mit Doxzyklin behandelt. Als Kontrollzellen wurden *Non-silencing* (NS)-Zellen benutzt. Dies sind Zellen, welche eine unspezifische shRNA-Zielsequenz beinhalten und somit keine Protein-Depletion verursachen. In Abbildung 5.2 A sind die Nek1-Proteinlevel nach 4-tägiger Doxzyklinbehandlung von den Klonen shNek1-1, shNek1-2 und von NS-Kontrollzellen gezeigt. Bei beiden shNek1-Klonen ist eine Reduktion des endogenen Nek1-Proteinniveaus um circa 80% zu beobachten.

In den folgenden Experimenten wurde die zelluläre Fähigkeit zur Koloniebildung in Abhängigkeit von Nek1 untersucht. Hierfür wurde eine definierte Anzahl von shNek1- oder NS-Zellen nach 4-tägiger Doxzyklinbehandlung ausgesät. 12 h nach der Aussaat wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt oder für 1h mit unterschiedlichen Konzentrationen Methylmethansulfonat (MMS) oder Mitomycin C (MMC) behandelt, sowie ein letztes Mal mit Doxzyklin versetzt. Nach 8 bis 10 Tagen Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien gefärbt und quantifiziert.

In shNek1-Zellen sind ohne zusätzliche DNA-Schadensinduktion circa 50 % weniger Kolonien zu beobachten als in Nek1-profizienten Kontrollzellen (Abbildung 5.2 B). Diese verminderte *Plating efficiency* deutet auf eine reduzierte Proliferationsfähigkeit von Nek1-defizienten Zellen hin. Zusätzlich zeigen shNek1-Zellen im Vergleich zu Nek1-profizienten NS-Zellen eine zunehmend verminderte Fähigkeit zur Koloniebildung nach ansteigenden Konzentrationen von MMS oder MMC (Abbildung 5.2 C,D). Die Fähigkeit zur Koloniebildung von Nek1-defizienten Zellen ist im Vergleich zu Nek1-profizienten Zellen nach Bestrahlung ebenfalls beeinträchtigt, aber in einer vergleichsweise milderer Ausprägung als nach MMS- oder MMC-Behandlung (Abbildung 5.2 C,D,E).

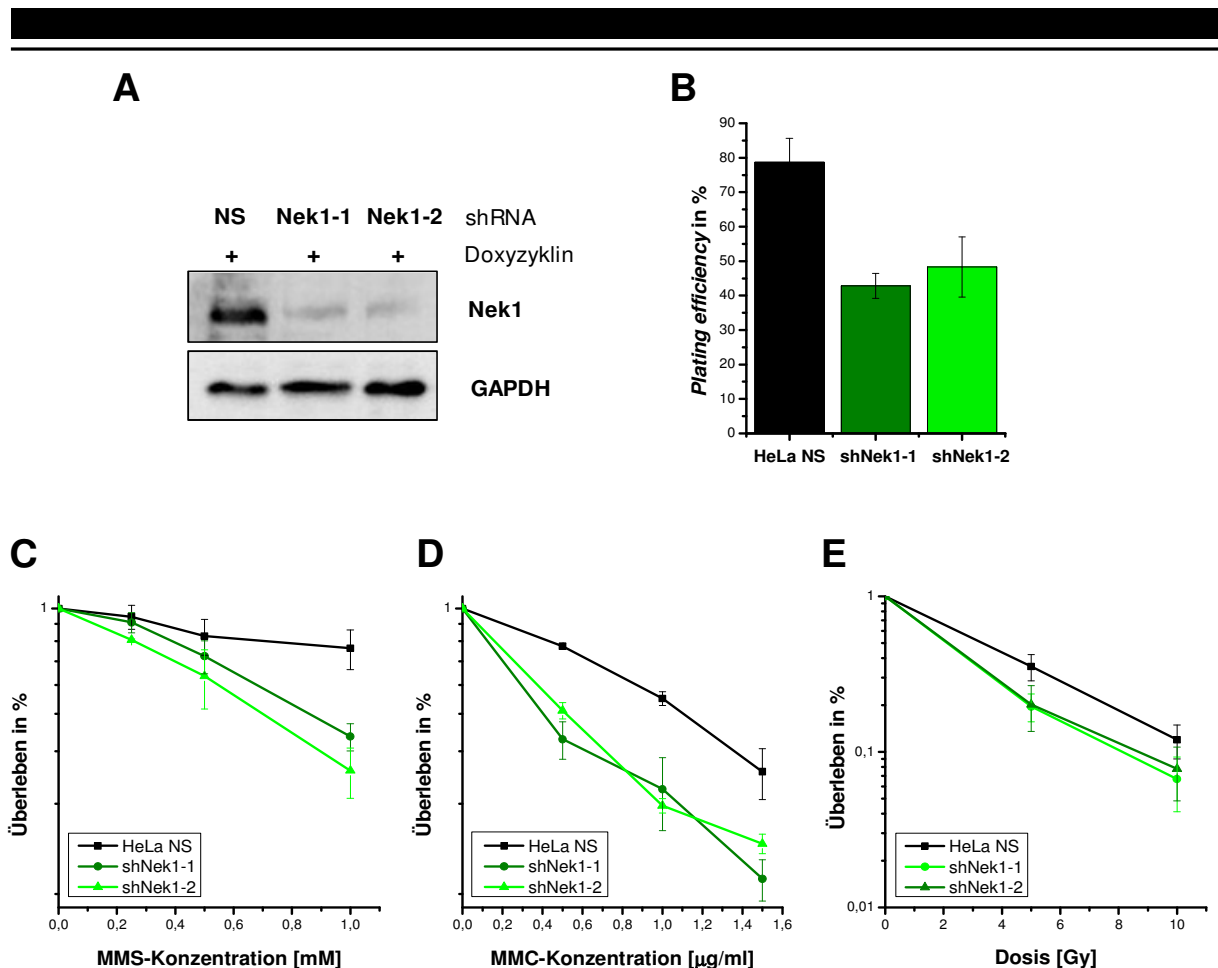


Abbildung 5.2: Überlebenskurven nach MMS, MMC und Röntgenstrahlung in Nek1-defizienten Zellen

(A) Quantitative Proteinanalyse der Nek1-Expression in Nek1-profizienten Zellen (NS) und Nek1-defizienten Zellen (shNek1-1 und shNek1-2) nach Doxyzyklinbehandlung.

(B) *Plating efficiency* von NS-Kontrollzellen, shNek1-1- und shNek1-2-Zellen.

(C,D,E) Überlebenskurven von Nek1-profizienten und Nek1-defizienten Zellen nach:

(C) 1-stündiger MMS-Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen

(D) 1-stündiger MMC-Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen

(E) Röntgenbestrahlung mit unterschiedlichen Dosen

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte.

MMS und MMC sind typische alkylierende Agenzien, welche DNA-Schäden erzeugen, die einer HR-spezifischen DNA-Reparatur unterliegen (Ensminger et al., 2014; Kee and D'Andrea, 2010). Es werden hierbei an der DNA Basenmethylierungen (MMS) oder *Interstrand-crosslinks* (MMC) induziert. Die Reparatur dieser DNA-Schäden über Basen- bzw. Nukleotidexzisionsreparatur führt in beiden Fällen zur Induktion von Einzelstrangbrüchen. Treffen Replikationsgabeln auf solche Einzelstrangbrüche, führt dies zum Kollaps der Replikationsgabeln und es entstehen DSBs, welche wiederum über HR-Prozesse repariert werden (Ensminger et al., 2014; Kee and D'Andrea, 2010). Bei HR-Mutanten ist die hohe Sensitivität nach MMS- bzw. MMC-Behandlung in Überlebensexperimenten ein markantes phänotypisches Merkmal (Essers et al., 1997; Nikolova et al.,

2010). In dem Modellorganismus *S. cerevisiae* wurde nach MMS-Behandlung bereits eine verminderte Fähigkeit zur Koloniebildung in Mutanten des NIMA/Nek1-Homologs Kin3 festgestellt (Moura et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund nun erstmals im humanen System bestätigt werden. Da Nek1-defiziente Zellen ebenfalls sehr sensitiv auf MMS- oder MMC-induzierte DNA-Schäden reagieren, könnte man vermuten, dass Nek1 an solchen HR-spezifischen Reparaturprozessen beteiligt ist. Es sind jedoch auch andere Reparaturwege wie z.B. die Basenexzisionsreparatur oder der Fanconi-Anämie-Reparaturweg für die DNA-Reparatur nach DNA-Schädigung mit alkylierenden Agenzien involviert, daher wäre auch eine Beteiligung von Nek1 bei solchen Prozessen nicht auszuschließen (Kim and D'Andrea, 2012).

Im Vergleich zu MMS und MMC konnte nach Röntgenbestrahlung nur eine vergleichsweise geringe Strahlensensitivität der Nek1-defizienten Zellen detektiert werden (Abbildung 5.2 E). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass nach Bestrahlung einer asynchronen Zellpopulation DSBs in allen Zellzyklusphasen induziert werden. In der G1-Phase ist die Homologe Rekombination inaktiv und DSBs werden nur über das NHEJ repariert. Auch in der S- und G2- Phase ist NHEJ weiterhin der dominante Reparaturweg und nur circa 15 - 20 % der induzierten DSBs werden über HR repariert. Somit ist zu erwarten, dass der Phänotyp von HR-defizienten Zellen aufgrund des relativ kleinen DSB-Reparaturanteils gering ausgeprägt ist (Beucher et al., 2009; Kirshner et al., 2009). MMS- oder MMC-verursachte DSBs werden im Gegensatz zu Strahlen-induzierten DSBs fast ausschließlich über HR repariert was folglich zu stärkeren HR-Phänotypen führt (Moura et al., 2010). Dieses Ergebnis unterstützt desweiteren eine Beteiligung von Nek1 bei der HR.

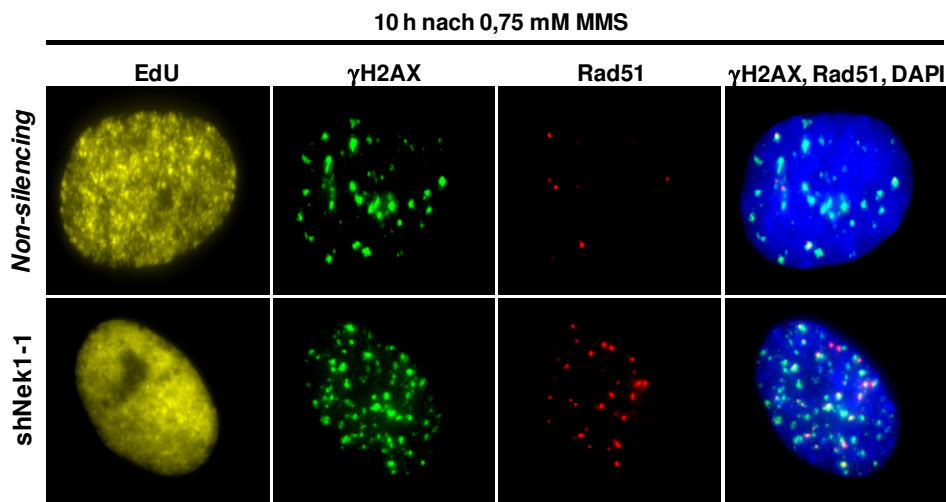
5.1.3 Die Rolle von Nek1 bei der DSB-Reparatur in der S-Phase

Die vermehrt auftretenden Chromatidbrüche nach Replikationsstress in Nek1-defizienten ErDa-Zellen (siehe 5.1.1) und die erhöhte Sensitivität nach MMS- und MMC-Behandlung (siehe 5.1.2) könnten auf eine Beeinträchtigung der DSB-Reparatur in der S-Phase hinweisen. Um den Einfluss von Nek1 während der DSB-Reparatur in der S-Phase direkt zu untersuchen, wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach einer 0,75 mM MMS-Behandlung in Nek1-profizienten oder -defizienten S-Phase-Zellen die Rad51-Foci bzw. γ H2AX-Foci gemessen.

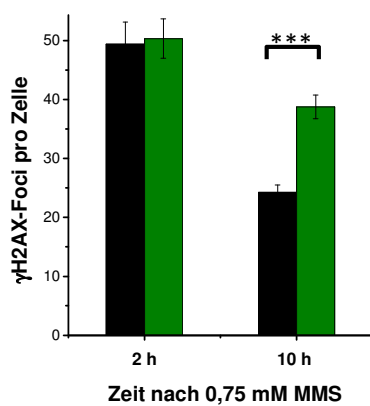
Das Histon H2AX wird nach DSB-Induktion maßgeblich von der Sensorkinase ATM am Serin139 phosphoryliert. Die phosphorylierte Histonvariante wird als γ H2AX bezeichnet und spielt bei der Schadenserkennung eine wichtige Rolle. Jeder γ H2AX-Focus repräsentiert folglich einen unreparierten DSB und die Quantifizierung dieser Foci zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten stellt somit ein Maß für die DSB-Reparaturfähigkeit einer Zelle dar (Löbrich et al., 2010). Es wurden ausschließlich γ H2AX-Foci in Zellen quantifiziert, die sich zum Zeitpunkt der MMS-Behandlung in

der S-Phase-Zellen befanden. Hierfür wurden die Zellen während der MMS-Behandlung zusätzlich mit EdU behandelt, sodass EdU in die DNA inkorporiert wurde und diese Zellen über eine EdU-Färbung identifiziert werden konnten. In Abbildung 5.3 A ist repräsentativ jeweils eine EdU-positive NS- bzw. shNek1-1-Zelle mit γ H2AX-Foci und kolokalisierenden Rad51-Foci dargestellt. Das Proteinlevel von Nek1 wurde in shNek1-Zellen durch eine 4-tägige Doxyzyklinbehandlung depletiert.

A



B



C

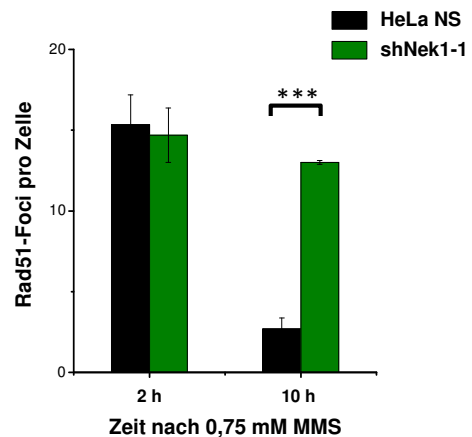


Abbildung 5.3: Reparatur von MMS-induzierten DSBs in der S-Phase

(A) Repräsentatives Bild von 1000-fach vergrößerten NS- bzw. shNek1-1-Zellkernen 10h nach MMS-Behandlung. Zellkerne weisen γ H2AX- und Rad51-Foci sowie eine positive EdU-Färbung auf.

(B,C) Quantifizierung von DSB-Foci in Nek1-profizienten (NS) oder Nek1-defizienten (shNek1-1) Zellen 2 h bzw 10 h nach MMS-Behandlung.

(B) Quantifizierung von γ H2AX-Foci in EdU-markierten S-Phase-Zellen.

(C) Quantifizierung von Rad51-Foci in EdU-markierten S-Phase-Zellen.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollwerte der jeweilig unbestrahlten Zellen wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Der Signifikanzwert wurde mittels t-Test ermittelt. (***: p<0,001)

γ H2AX-Foci wurden 2 und 10 h nach MMS-Behandlung gemessen. Der 2 h-Zeitpunkt nach MMS-Behandlung repräsentiert das Maximum der Schadensausprägung und ist deshalb als Induktionszeitpunkt zu betrachten. Dies ist dadurch zu erklären, dass nach Beendigung der MMS-Behandlung weiterhin Replikationsgabeln auf Einzelstrangbrüche treffen, die durch die Basenexzisionsreparatur entstanden sind. Dieser Effekt führt bis 2 h nach der MMS-Behandlung zur Entstehung von zusätzlichen DSBs (Ensminger et al., 2014). Der 10 h-Reparaturzeitpunkt wurde ausgewählt, um die Reparaturfähigkeit der Nek1-defizienten Zellen zu untersuchen, denn zwischen 2 und 10 h wird in Kontrollzellen ein beträchtlicher Teil der induzierten DNA-Schäden repariert (Ensminger et al., 2014).

Doxyzyklin-behandelte shNek1-1-Zellen zeigen eine ähnliche Induktion von γ H2AX-Foci wie Nek1-profiziente Zellen. 2 h nach MMS-Behandlung ist jeweils ein durchschnittliches Level von circa 50 γ H2AX-Foci pro Zelle zu detektieren (Abbildung 5.3 B). Nek1-profiziente Zellen haben 10 h nach der MMS-Behandlung bereits die Hälfte aller induzierten DSBs repariert. Nek1-defiziente Zellen weisen jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen etwa 15 zusätzlichen γ H2AX-Foci auf (Abbildung 5.3 A,B). Neben γ H2AX-Foci als Marker für DSBs wurden zusätzlich Rad51-Foci analysiert, welche als Marker für die Resektion während der Homologen Rekombination verwendet werden (Essers et al., 2002). 2 h nach MMS-Behandlung ist in Nek1-defizienten und –profizienten Zellen ein durchschnittliches Level von circa 15 Rad51-Foci pro Zelle zu detektieren (Abbildung 5.3 C). Nach einer Reparaturzeit von insgesamt 10 h weisen Nek1-profiziente Zellen eine deutliche Reduktion des Rad51-Foci-Levels auf, während in Nek1-defizienten Zellen kein Rückgang der Anzahl von Rad51-Foci zu beobachten ist (Abbildung 5.3 A,C).

Da in Nek1-defizienten Zellen die Ausbildung (2 h nach Bestrahlung) der Rad51-Foci normal ausgeprägt ist, scheint die Resektion der DSBs Nek1-unabhängig zu sein. Allerdings deuten die persistierenden Rad51-Foci 10 h nach Schadensinduktion auf eine Nek1-abhängige Auflösung der Rad51-Foci-Strukturen hin. Diese Beobachtung unterstützt erneut die Vermutung, dass Nek1 in den Reparaturprozess der HR involviert sein könnte. Diese Beeinträchtigung im Abschluss der HR spiegelt sich in Nek1-depletierten Zellen ebenfalls 10 h nach MMS-Behandlung auf γ H2AX-Ebene in einer erhöhten Anzahl von unreparierten DSBs wider.

Es ist bekannt, dass MMS-induzierte DSBs über HR-Reparaturwege repariert werden (Nikolova et al., 2010). Allerdings ist es verwunderlich, dass circa 50 DSBs induziert werden, aber durchschnittlich nur 15 Rad51-Foci pro Zelle ausgebildet werden. Man könnte erwarten, dass pro induziertem DSB ein Rad51-Focus zu detektieren sein müsste. Der beobachtete Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass Rad51 nur innerhalb einer intermediären Zeitspanne während der HR sichtbar wird, γ H2AX-Foci hingegen über einen längeren Zeitraum detektierbar sind. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung, dass γ H2AX-Foci in Nek1-defizienten Zellen nicht vollständig persistieren (siehe Abbildung 5.3 B).

Es werden zwischen 2 und 10 h circa 10 DSBs repariert. Das könnte bedeuten, dass Nek1-defiziente Zellen gegenüber Nek1-profizienten Zellen eventuell stark verlangsamt reparieren oder ein Teil der DSBs über einen alternativen, Nek1-unabhängigen Reparaturweg behoben wird.

5.1.4 Die Rolle von Nek1 bei der DSB-Reparatur in der G2-Phase

Nach der Analyse der Nek1-abhängigen DSB-Reparatur in der S-Phase sollte auch die Rolle von Nek1 in der G2-Phase untersucht werden. In dieser Zellzyklusphase sind sowohl NHEJ als auch HR aktiv, und im Gegensatz zur S-Phase müssen hier Replikations-assoziierte Prozesse, welche zu DSBs führen könnten, nicht berücksichtigt werden. Daher stellt die G2-Phase eine besonders geeignete Zellzyklusphase für die Untersuchung der Nek1-abhängigen DSB-Reparatur dar. Desweiteren lassen sich die Reparaturwege NHEJ und HR aufgrund ihrer unterschiedlichen Reparaturkinetiken in der G2-Phase differenziert betrachten. In der G2-Phase tritt ein biphasisches DSB-Reparaturverhalten nach Bestrahlung auf, welches in eine schnelle und langsame Reparaturkomponente gegliedert werden kann. Die schnelle Kinetik beschreibt die frühe DSB-Reparatur, welche durch das NHEJ repräsentiert wird. So weisen NHEJ-defiziente Zellen bereits 1 bis 2 h nach Bestrahlung einen Defekt in der DSB-Reparatur auf. Im Gegensatz dazu wird die langsame Reparaturkomponente durch den komplexen Reparaturvorgang der HR repräsentiert. HR-spezifische DSB-Reparaturdefekte können aufgrund der langandauernden Reparatur in humanen Zellen frühestens 6 bis 8 h nach Bestrahlung detektiert werden (Beucher et al., 2009; Riballo et al., 2004)

Um die DSB-Reparatur in Abhängigkeit von Nek1 zu untersuchen, wurde mittels RNA-Interferenz (siRNA) das Nek1-Proteinlevel in HeLa-S3-Zellen herunterreguliert. Um den Einfluss von Nek1 auf die DSB-Reparatur mit etablierten HR-Reparaturfaktoren vergleichen zu können, wurden ebenfalls BRCA2 oder Rad54 mittels siRNA in HeLa-S3-Zellen herunterreguliert. Die Depletion der jeweiligen Proteinlevel wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft und ist in Abbildung 5.4 A dargestellt. Für die Induktion von DSBs in der G2-Phase wurden die siRNA-behandelten Zellen mit 2 Gy bestrahlt. Die induzierten DSBs wurden in der G2-Phase nach unterschiedlichen Reparaturzeiten mittels des DSB-Markers γ H2AX und des HR-Markers Rad51 quantifiziert. In Abbildung 5.4 B sind repräsentativ kolokalisierende γ H2AX- und Rad51-Foci von den verschiedenen Protein-depletierten G2-Phase Zellen dargestellt. G2-Phase-Zellen wurden mikroskopisch durch Messung des DNA- und EdU-Gehalts identifiziert (siehe 4.2). EdU wurde kurz vor der Bestrahlung zu den Zellen gegeben, um die S-Phase-Zellen anhand ihrer positiven EdU-Färbung von den G2-Phase-Zellen unterscheiden zu können.

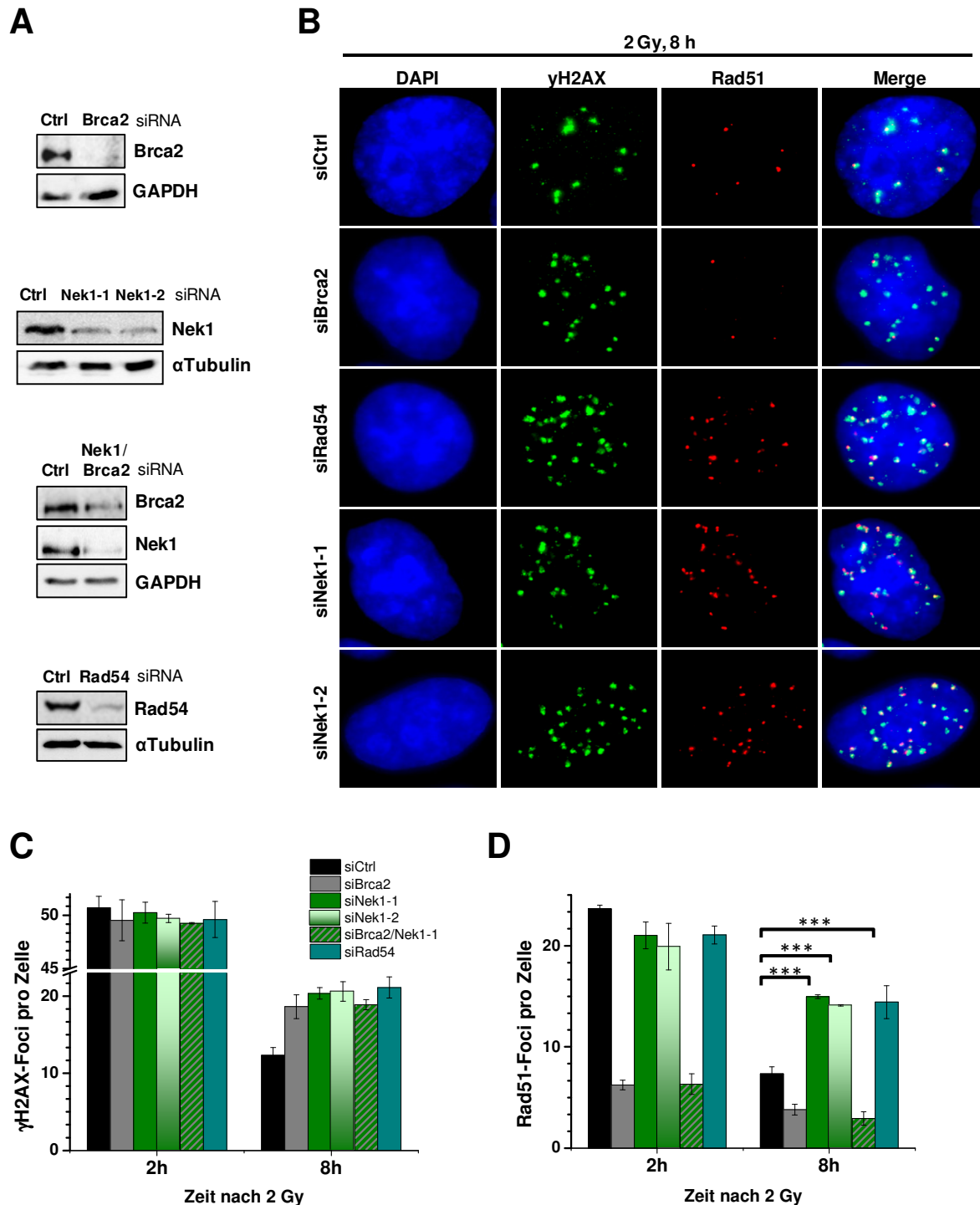


Abbildung 5.4: Reparatur von Röntgenstrahlen-induzierten DSBs in der G2-Phase

(A) Analyse der durch RNA-Interferenz herbeigeführten Protein-Depletion von BRCA2, Nek1/BRCA2, Nek1 und Rad54 mittels Western-Blot.

(B) Repräsentatives Bild zeigt γ H2AX- und Rad51-Foci in unterschiedlich Protein-depletierten G2-Phase-Zellen in 1000-facher Vergrößerung.

(C,D) Bestrahlte (2 Gy) G2-Phase-Zellen wurden identifiziert und deren DSB-Foci analysiert:

(C) Quantifizierung von γ H2AX-Foci in BRCA2-, Nek1/BRCA2-, Nek1- und Rad54-depletierten G2-Phase-Zellen.

(D) Quantifizierung von Rad51-Foci in BRCA2-, Nek1/BRCA2-, Nek1- und Rad54-depletierten G2-Phase-Zellen.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollwerte der jeweilig unbestrahlten Zellen wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Der Signifikanzwert wurde mittels t-Test ermittelt. (***: $p < 0,001$)

Für die Analyse der DSB-Reparaturkapazität wurde der 2 h- und 8 h-Reparaturzeitpunkt gewählt, da man zu diesen Zeitpunkten zwischen HR- und NHEJ-spezifischen DSB-Reparaturdefekten unterscheiden kann. 2 h nach Bestrahlung weisen Rad51-Foci zudem eine maximale Anzahl auf, was für Aussagen über die HR-Frequenz wichtig sein könnte (Beucher et al., 2009).

2 h nach Bestrahlung ist bei allen siRNA-Bedingungen zu erkennen, dass das γ H2AX-Foci-Level circa 50 γ H2AX-Foci pro G2-Phase-Zelle beträgt (Abbildung 5.4 C). 8 h nach Bestrahlung zeigen die mit siCtrl-behandelten Zellen durchschnittlich circa 12 γ H2AX-Foci pro Zelle. Die mit BRCA2-, Rad54-, Nek1- oder BRCA2/Nek1-siRNA behandelten Zellen weisen jedoch ein erhöhtes Maß von circa 20 γ H2AX-Foci auf (Abbildung 5.4 B,C). Bei der Analyse von Rad51-Foci ergibt sich ein noch differenzierteres Bild. Zunächst ist auffällig, dass BRCA2- oder BRCA2/Nek1-depletierte Zellen 2 h und 8 h nach Bestrahlung eine stark reduzierte Anzahl von Rad51-Foci im Vergleich zu siCtrl-Zellen aufweisen. Dieses geringe Level ist auf die bekannte Rad51-Rekrutierungsfunktion von BRCA2 zurückzuführen (Carreira et al., 2009). Im Gegensatz dazu sind 2 h nach Bestrahlung in siCtrl-, siNek1- und siRad54-behandelten Zellen circa 20 Rad51-Foci zu detektieren (Abbildung 5.4 D), während zum 8 h Reparaturzeitpunkt Nek1- oder Rad54-depletierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen etwa 7-8 zusätzliche Rad51-Foci besitzen (Abbildung 5.4 B,D).

Es ist festzuhalten, dass Rad54- und Nek1-depletierte Zellen 8 h nach Bestrahlung auf γ H2AX-Foci-Ebene einen mit BRCA2-depletierten Zellen vergleichbaren DSB-Reparaturdefekt aufweisen. Nek1- und Rad54-depletierte Zellen weisen zudem einen ähnlichen DSB-Reparaturdefekt auf der Ebene von Rad51-Foci auf, wobei BRCA2-depletierte Zellen bereits eine Defizienz in der Ausbildung dieser Foci aufzeigen.

Der spät auftretende DSB-Reparaturdefekt 8 h nach Bestrahlung in Nek1-defizienten Zellen weist auf eine spezifisch Beteiligung von Nek1 in der langsamen DSB-Reparaturkomponente hin, welche in der G2-Phase die HR darstellt (Beucher et al., 2009; Löbrich et al., 2010). Untermauert wird eine Beteiligung von Nek1 bei der HR durch persistierende Rad51-Foci in Nek1-depletierten Zellen 8 h nach Bestrahlung, denn jeder persistierende Rad51-Fokus repräsentiert ebenfalls ein nicht abgeschlossenes HR-Ereignis. Zusätzlich konnte durch die gleichzeitige Herunterregulation von Nek1 und BRCA2 herausgefunden werden, dass beide Proteine im gleichen DSB-Reparaturweg involviert sind, und dass BRCA2 vor Nek1 am HR-Prozess beteiligt ist, da sich der Phänotyp der Ko-Depletion und der BRCA2-Depletion auf γ H2AX- und Rad51-Foci-Ebene entsprechen.

Interessanterweise ist zu beachten, dass Rad54-depletierte Zellen auf γ H2AX- und Rad51-Foci-Ebene die gleichen Effekte wie Nek1-depletierte Zellen zeigen (siehe Abbildung 5.4 C,D). Für Rad54 wurde bereits beschrieben, dass es bei einem der letzten Schritte der HR beteiligt ist. Nach der Stranginvasion katalysiert Rad54 die Dissoziation von Rad51-Molekülen von der Heteroduplex-DNA, sodass in Abwesenheit von Rad54 die DNA-gebundenen Rad51 Moleküle persistieren und nicht entfernt werden können (Heyer et al., 2006). Es ist weiterhin bekannt, dass Rad51 effizient von der

DNA entfernt werden muss um DNA-Synthese zu initiieren und somit den HR-Prozess vollständig abschließen zu können (Terasawa et al., 2007). Der gleiche Phänotyp von Nek1- und Rad54-depletierten Zellen bei der DSB-Reparatur nach Bestrahlung, lässt vermuten, dass auch Nek1 die Dissoziation von Rad51 beeinflusst und ebenfalls an einem späten Schritt der HR beteiligt ist.

5.1.5 Komplementationsstudien zur Nek1-abhängigen DSB-Reparatur in der G2-Phase

Um die Spezifität des DSB-Reparaturdefektes in Nek1-depletierten G2-Phase-Zellen zu überprüfen, wurden sogenannte Komplementationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde das endogene Nek1-Proteinlevel mittels siRNA in HeLa-S3-Zellen herunterreguliert und durch exogenes, siRNA-resistentes GFP-Nek1-wt- oder GFP-Nek1-K33R-Protein mittels Plasmid-Transfektion ersetzt. Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass die Nek1-Punktmutation K33R zu einer Dysfunktion der Kinase-Aktivität führt (Liu et al., 2013). So sollte anhand dieser Mutante überprüft werden, ob die Kinase-Aktivität von Nek1 bei der HR benötigt wird. Als weitere Kontrollen wurden Nek1-profiziente oder -defiziente Zellen mit reinen GFP-Plasmiden transfiziert. Die jeweilige Protein-Depletion bzw. -Expression wurde mittels Western-Blot überprüft und ist in Abbildung 5.5 A dargestellt. 8 h nach Bestrahlung (2 Gy) wurde ausschließlich in GFP-positiven G2-Phase-Zellen die Anzahl von γ H2AX-Foci quantifiziert. G2-Phase-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.4 und 5.1.4 beschrieben mikroskopisch durch Messung des DNA- und EdU-Gehalts bestimmt.

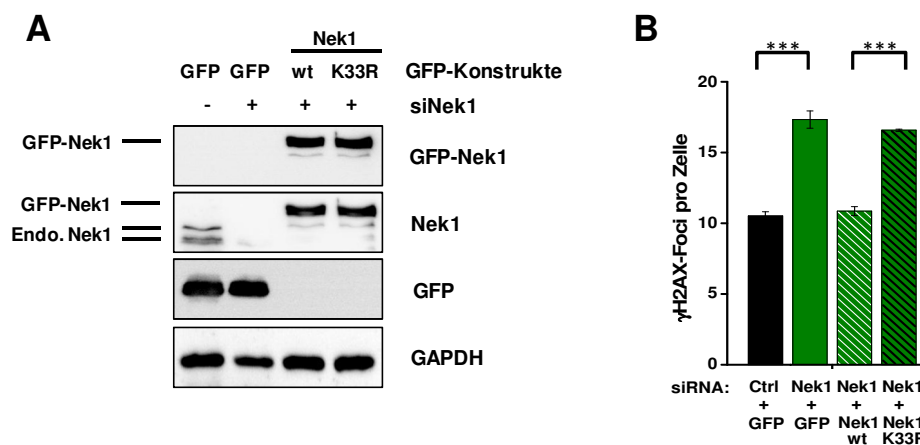


Abbildung 5.5: Komplementationsstudien mit Nek1-wt und Kinase-inaktivem Nek1-K33R

- (A) Repräsentativer Western-Blot der Expression-Niveaus von endogenem und exogenem Nek1 nach RNAi (siCtrl oder siNek1) und Plasmidtransfektion mit GFP, GFP-Nek1-wt, oder GFP-Nek1-K33R. Die eingezeichneten Striche indizieren das unterschiedliche Molekulargewicht von endogenem Nek1 bzw. von exogenem GFP-Nek1
- (B) Quantifizierung von γ H2AX-Foci in den jeweilig transfizierten Zellen. 8 h nach Bestrahlung wurden γ H2AX-Foci in GFP-positiven G2-Phase-Zellen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollwerte der jeweilig unbestrahlten Zellen wurden subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Der Signifikanzwert wurde mittels t-Test ermittelt. (***: $p < 0,001$)

Die Depletion von Nek1 bewirkt in GFP-positiven Zellen einen DSB-Reparaturdefekt von etwa sieben zusätzlichen γ H2AX-Foci im Vergleich zu Nek1-profizienten Zellen (Abbildung 5.5 B). Nek1-wt-transfizierte Zellen zeigen ein ähnliches γ H2AX-Foci Niveau wie Nek1-profiziente Zellen. Im Gegensatz dazu ist in Nek1-K33R-transfizierten Zellen ein ähnlich hohes γ H2AX-Foci-Level wie in GFP-transfizierten Nek1-defizienten Zellen zu detektieren (Abbildung 5.5 B).

Zusammenfassend kann der charakteristische DSB-Reparaturdefekt 8 h nach Bestrahlung in Nek1-defizienten Zellen durch die Expression von exogenem GFP-Nek1-wt aufgehoben werden. Die Komplementation mit der Kinase-inaktiven Nek1-K33R-Mutante hebt den DSB-Reparaturdefekt dagegen nicht auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Kinase-Aktivität von Nek1 eine wichtige Funktion für eine effiziente DSB-Reparatur in der langsamen Reparaturkomponente der G2-Phase besitzt. Diese Beobachtungen untermauern desweiteren eine spezifische Herunterregulation von Nek1 und lassen das Zustandekommen von *Off-target-effects* ausschließen (Jackson and Linsley, 2010). Diese Komplementationsstudien bestätigen erneut, dass aktives Nek1 eine wichtige Rolle während der DSB-Reparatur einnimmt und stellen ein wichtiges Kontrollexperiment für die in Kapitel 5.1.4 durchgeführten siRNA-Experimente dar.

5.2 Interaktionsstudien zwischen Nek1, Rad51 und Rad54

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Nek1- und Rad54-defiziente Zellen auf γ H2AX- und Rad51-Ebene einen ähnlichen DSB-Reparaturdefekt in der G2-Phase aufweisen, stellte sich die Frage, ob beide Proteine möglicherweise miteinander interagieren. Diese Fragestellung wurde mittels Ko-Immunpräzipitationen untersucht. Es wurden hierfür Zellkernextrakte von unbestrahlten oder bestrahlten HeLa-S3-Zellen hergestellt. Die Zellen wurden 6 h nach Bestrahlung (15 Gy) geerntet (siehe 4.7.1). Aus den jeweiligen Zellkernextrakten wurde endogenes Nek1-, Rad54- oder Rad51-Protein mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Durch Western-Blot-Analysen wurden die immunpräzipitierten Proteine nachgewiesen und zusätzliche Ko-Immunpräzipitationen untersucht (siehe 4.7.5).

Die Immunpräzipitation von Rad51 diene in diesem experimentellen Ansatz als Positivkontrolle, da bereits eine DNA-schadensvermittelte Interaktion von Rad51 mit Rad54 in der Literatur beschrieben wurde (Tan et al., 1999). In Abbildung 5.6 ist zu erkennen, dass nach Immunpräzipitation von endogenem Rad51 (IP: Rad51) Rad54 als ko-immunpräzipitiertes Protein deutlich nachweisbar ist, jedoch kein Nek1 zu detektieren ist. Immunpräzipitiertes Rad54 (IP: Rad54) weist hingegen im Immunkomplex sowohl Rad51 als auch Nek1 auf. Nach Immunpräzipitation von Nek1 (IP: Nek1) ist konsistenterweise ko-immunpräzipitiertes Rad54 zu detektieren, jedoch kein Rad51 nachweisbar.

Es ist festzuhalten, dass Nek1 mit Rad54 aber nicht mit Rad51 physisch interagiert. Außerdem ist zu erkennen, dass diese Interaktion nach Bestrahlung deutlich zunimmt (Abbildung 5.6), was auf eine DNA-schadensinduzierte Interaktion hinweist. Die hier nachgewiesene Interaktion zwischen Nek1 und Rad54 wird durch eine weitere Studie unterstützt, in welcher *Yeast two-hybrid*-Analysen durchgeführt wurden. Hierbei wurde das Rad54-Homolog ATRX als Interaktionspartner von Nek1 identifiziert (Surpili et al., 2003). ATRX ist ein Chromatin-Remodeller und weist hochkonservierte Sequenzübereinstimmungen mit Rad54 auf (Thomä et al., 2005).

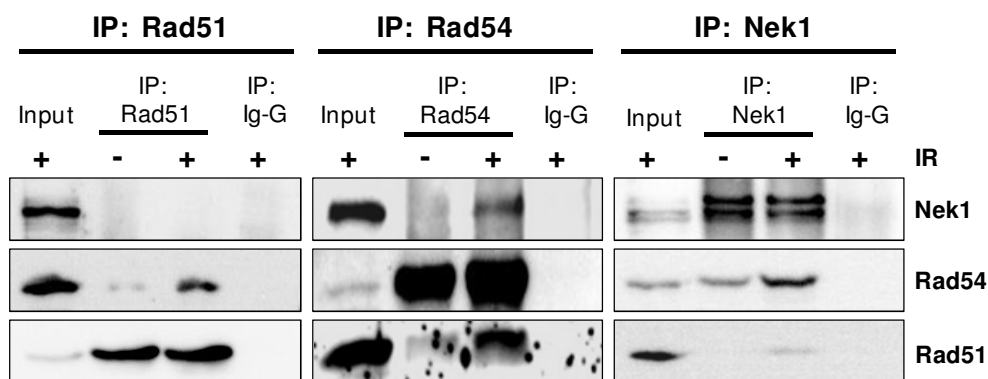


Abbildung 5.6: Immunpräzipitation von Nek1, Rad54 oder Rad51

HeLa-S3Zellen wurden mit 15 Gy bestrahlt und 6 h später geerntet. Von unbestrahlten bzw. bestrahlten Zellen wurden Zellkernextrakte hergestellt und jeweils die Proteine Nek1, Rad54 oder Rad51 immunpräzipitiert. Mittels Western-Blot wurden anschließend die jeweiligen Proteine detektiert. Als Input wurden jeweils 2 % der eingesetzten Gesamtproteinmenge aufgetragen, die 2 - 3 mg betrug. Als jeweilige Kontrolle wurde anstatt spezifischer Antikörper unspezifisches IgG-Serum eingesetzt. Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal wiederholt. Es sind repräsentative Blots eines Experimentes gezeigt.

5.3 Phosphorylierungsstudien von Rad54

Da eine Interaktion zwischen Nek1 und Rad54 nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Interaktion. Es ist bekannt, dass Nek1 bevorzugt Phospho-Motive wie **F-X-X-S** an dessen Serin phosphoryliert (Surpili et al., 2003). Bei einer Sequenzanalyse von Rad54 wurden drei solcher Motive am Serin 72, 344 und 572 mit dem Programm *CLC Sequence Viewer* identifiziert. Von diesen drei Motiven ist nur das Serin572 in einer hoch konservierten DNA-bindenden ATPase Domäne lokalisiert (Thomä et al., 2005) (Abbildung 5.7 A). Um zu untersuchen, ob Rad54 von Nek1 am Ser572 phosphoryliert wird, wurde ein *in vitro Kinase Assay* durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-S3-Zellen mit GFP-Rad54-Plasmiden transfiziert. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mit einem spezifischen GFP-Antikörper GFP-Rad54-Fusionsproteine immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit konstitutiv aktivem Nek1-Protein inkubiert und

anschließend mit einem phospho-spezifischen pRad54(S572)-Antikörper mittels Western-Blot analysiert.

Es ist ein deutliches pRad54-Signal nach Inkubation des immunpräzipitierten GFP-Rad54-wt mit Nek1 zu erkennen (Abbildung 5.7 B). Dies weist auf eine Nek1-vermittelte Phosphorylierung am Ser572 *in vitro* hin. Um dieses Ergebnis zu kontrollieren, wurde zusätzlich die Phosphorylierung an einer GFP-Rad54-Phospho-Mutante untersucht. Hierzu wurde zuvor das Serin572 von Rad54 zu Alanin (S572A) mittels *site-directed-mutagenesis* verändert (Abbildung 5.7 A). Nach Immunpräzipitation von GFP-Rad54-S572A und Behandlung mit aktivem Nek1 ist wie zu erwarten kein Phosphorylierungssignal mittels phospho-spezifischem Rad54-Antikörper zu detektieren (Abbildung 5.7 B). Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Spezifität des Antikörpers. Als Kontrolle der Immunpräzipitationseffizienz wurden GFP-Signale detektiert. Zusammenfassend weist das in Abbildung 5.7 B dargestellte Ergebnis darauf hin, dass Rad54 (wt) von Nek1 *in vitro* am Ser572 phosphoryliert wird.

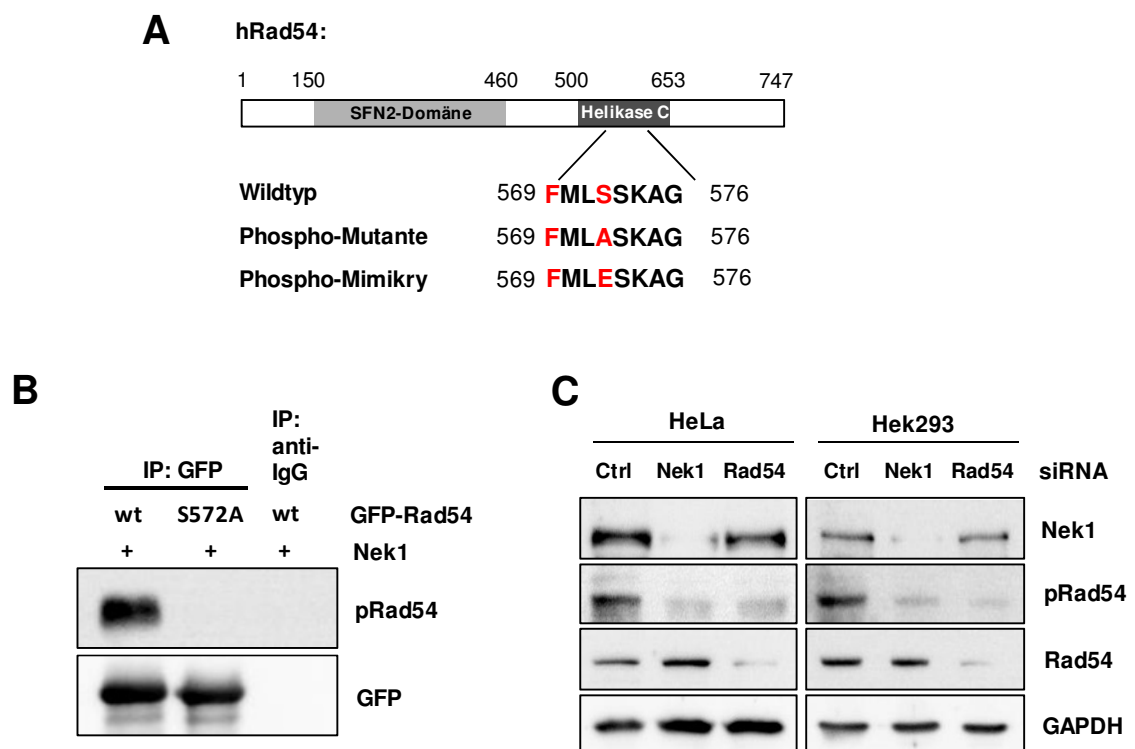


Abbildung 5.7: Nek1 phosphoryliert Rad54 *in vitro* und *in vivo*

- (A) Schematische Darstellung des Rad54-Proteins sowie Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle am Serin572. Durch *site-directed-mutagenesis* wurde eine Punktmutation von Serin572 zu Alanin (A) bzw. zu Glutamat (E) erzeugt.
- (B) *In vitro Kinase Assay*. Konstitutiv aktives Nek1-Protein wurde unter Anwesenheit von ATP mit immunpräzipitiertem GFP-Rad54-wt oder GFP-Rad54-S572A inkubiert. Proteinlevel von GFP und pRad54 wurden mittels Western-Blot analysiert.
- (C) *In vivo Kinase Assay*. Analyse des pRad54-Levels nach Protein-Depletion von Nek1 oder Rad54 mittels RNAi in Hek293- oder HeLa-S3-Zellen. Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, 6 h später Gesamtzellextrakte hergestellt und mittels Western-Blot analysiert.

Western-Blots wurden in drei unabhängigen Experimenten wiederholt und bestätigt. Es sind repräsentative Blots eines Experimentes gezeigt.

Um zu überprüfen, ob Rad54 ebenfalls *in vivo* von Nek1 phosphoryliert werden kann, wurde mittels RNAi das Nek1-Proteinlevel in HeLa-S3- oder Hek293-Zellen depletiert. 6 h nach Bestrahlung mit 10 Gy wurden die zuvor Nek1-depletierten Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Proteinlevel von Nek1, pRad54 und Rad54 wurden mittels Western-Blot analysiert und GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im Vergleich zu siCtrl-Zellen ist nach Nek1-Depletion in beiden Zelllinien nur noch ein Hintergrundlevel von pRad54 zu detektieren, wobei das Proteinlevel von Rad54 in beiden Proben gleich ist (Abbildung 5.7 C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Rad54 abhängig von Nek1 am Ser572 *in vivo* phosphoryliert wird. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich Rad54 mittels RNAi herunterreguliert, was erwartungsgemäß sowohl auf pRad54- als auch auf Rad54-Ebene zu einer Reduktion des Proteinlevels führte (Abbildung 5.7 C).

Es konnte zwar etabliert werden, dass Rad54 *in vitro* und *in vivo* von Nek1 am Ser572 phosphoryliert wird, jedoch kann auf Grundlage dieser Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass Rad54 an zusätzlichen Stellen Nek1-abhängig phosphoryliert wird. Aus internen Studien der AG Löbrich ging allerdings hervor, dass Rad54 von Nek1 nur am Ser572 phosphoryliert wird. Es wurden hierfür Phosphorylierungsstudien an GFP-Rad54-wt und GFP-Rad54-S572A mit radioaktivem ATP, sowie konstitutiv aktivem Nek1 durchgeführt und die Rad54-Proteine mittels Autoradiographie analysiert. Dies hat gegenüber phospho-spezifischen Antikörpern den Vorteil, dass alle Nek1-spezifischen Phosphorylierungen des gesamten Rad54-Proteins detektiert werden können. Es war zu beobachten, dass nur GFP-Rad54-wt und nicht GFP-Rad54-S572A ein Phosphorylierungssignal aufwiesen (persönlich berichtet von Dr. Olivia Barton). Dieses Ergebnis unterstützt erneut den Befund, dass Rad54 von Nek1 *in vitro* am Serin572 phosphoryliert wird. Darüber hinaus konnten bereits in anderen Studien einige Nek1-spezifische Phosphorylierungsstellen mit F-X-X-S-Sequenzen identifiziert und *in vivo* bestätigt werden, sodass dieses Motiv eine starke Erkennungssequenz für Nek1 zu sein scheint (Chen et al., 2009; Lanza et al., 2010).

5.4 Charakterisierung von Rad54-Phosphorylierungs-Mutanten

5.4.1 DSB-Reparaturstudien in Rad54-Mutanten

In diesem Kapitel soll die Funktion der Phosphorylierung von Rad54 am Serin572 bezüglich der DNA-Schadensrekrutierung und der DSB-Reparaturfähigkeit analysiert werden. Hierfür wird zum einen eine A-Mutante (GFP-Rad54-S572A) verwendet, die nicht phosphoryliert werden kann und somit einen unphosphorylierten Zustand widerspiegelt. Zum anderen wird eine zu Glutamat-mutierte E-Mutante (GFP-Rad54-S572E) verwendet, die aufgrund ihrer negativ geladenen Hydroxy-Gruppe eine permanente Phosphorylierung an Position 572 imitiert (Abbildung 5.7 A). Die zellulären

Funktionen von Rad54 können somit in Abhängigkeit des jeweiligen Phosphorylierungsstatus untersucht werden.

Um den Einfluss der Rad54-Phosphorylierung auf die Rekrutierung an den DNA-Schadensort zu untersuchen wurde eine Mikro-Laserbestrahlung durchgeführt. Hierbei wird entlang einer Laserspurs durch den Zellkern so viel Energie freigesetzt, dass massive DNA-Schäden entstehen und große Mengen von DNA-Reparaturproteinen an diese DNA-Schadensorte rekrutiert werden (Mailand et al., 2007). Hierfür wurden HeLa-S3-Zellen mit den unter Kapitel 5.3 beschriebenen GFP-Rad54-Mutanten transient transfiziert und 48 h später einer Mikro-Laserbestrahlung unterzogen. 2 h nach der Laserbestrahlung wurden die jeweiligen Zellen fixiert und gegen GFP, Rad51, EdU und DNA gefärbt. Rad51 wurde als DNA-Schadensmarker verwendet, um den Laser-induzierten DNA-Schaden erkennen zu können. Außerdem konnte Rad51 in diesem experimentellen Ansatz zusätzlich als Zellzyklusmarker verwendet werden, da Rad51 nur in der S- und G2-Phase an den DNA-Schadensort rekrutiert wird (Bekker-Jensen et al., 2006). Desweiteren wurden S-Phase-Zellen aufgrund ihrer positiven EdU-Färbung von der Analyse ausgeschlossen und somit nur G2-Phase-Zellen ausgewertet. In Abbildung 5.8 A ist zu erkennen, dass GFP-Rad54-wt, GFP-Rad54-S572A sowie GFP-Rad54-S572E in gleichem Maß entlang des DNA-Schadens lokalisiert sind. Folglich ist keine Beeinträchtigung der Rekrutierung von Rad54 aufgrund des Phosphorylierungsstatus anzunehmen.

Um den Einfluss des Rad54-Phosphorylierungsstatus auf die DSB-Reparaturkapazität untersuchen zu können, wurde das endogene Proteinniveau von Rad54 in HeLa-S3-Zellen mittels RNAi depletiert und siRNA-resistente GFP-Rad54-Plasmide (GFP-Rad54-wt, GFP-Rad54-S572A und GFP-Rad54-S572E) transient transfiziert. Die endogenen und exogenen Proteinlevel von Rad54 wurden mittels Western-Blot überprüft und sind in Abbildung 5.8 B dargestellt. Für die Analyse der Rad51-Foci wurde der 8 h-Reparaturzeitpunkt nach Bestrahlung mit 2 Gy gewählt, um HR-spezifische DSB-Reparaturdefekte messen zu können (Beucher et al., 2009). Desweiteren wurden nur EdU-negative G2-Phase-Zellen ausgewertet, welche physiologische Level von GFP-Rad54 exprimierten und somit Rad54-GFP-Foci ausbilden konnten (Abbildung 5.8 B). GFP-Rad54-überexpmierende Zellen wurden von der Quantifizierung der Rad51-Foci ausgeschlossen, da in anderen Studien berichtet wurde, dass unterschiedliche Stöchiometrien zwischen Rad54 und Rad51 deren Funktionen beeinträchtigen können (Fung et al., 2006).

In Abbildung 5.8 C ist zu erkennen, dass GFP-Rad54-S572A-exprimierende Zellen 8 h nach Bestrahlung circa 18 Rad51-Foci pro Zelle aufweisen. GFP-Rad54-wt- oder GFP-Rad54-S572E-Zellen zeigen hingegen durchschnittlich nur 10 Rad51-Foci pro Zelle. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die E-Mutante im Gegensatz zu der A-Mutante keinen Rad51-spezifischen DSB-Reparaturdefekt aufweist. Für weitere Untersuchungen wurde zusätzlich zu endogenem Rad54 auch endogenes Nek1 mittels RNAi depletiert und mit GFP-Rad54-wt oder GFP-Rad54-S572E komplementiert.

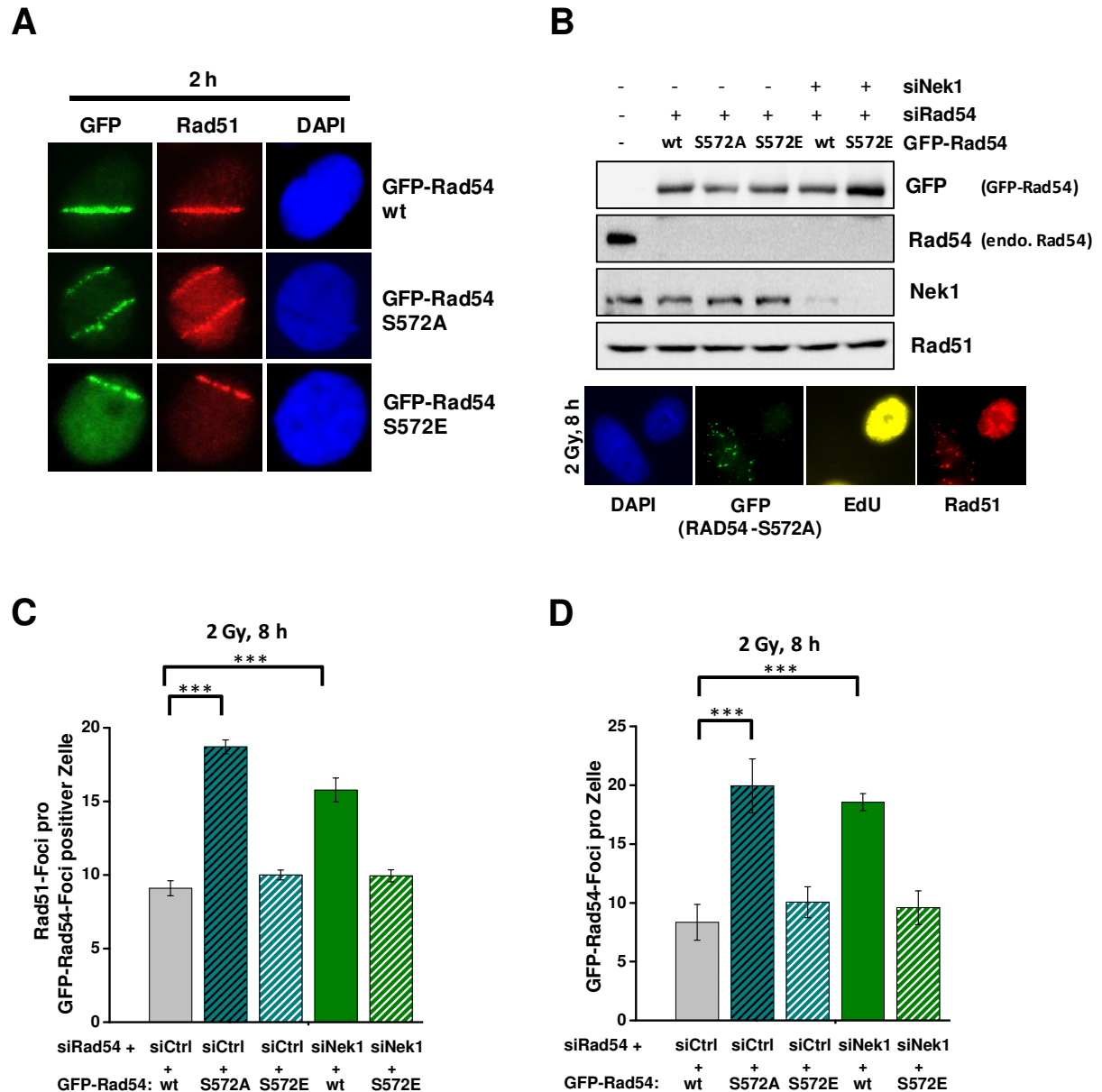


Abbildung 5.8: DNA-Schadensrekrutierung und DSB-Reparaturkapazität von Rad54-wt und Rad54-Mutanten

(A) Mikro-Laserbestrahlung von GFP-Rad54-exprimierenden HeLa-S3-Zellen (wt, S572A oder S572E). Die Zellen wurden 2 h nach DNA-Schädigung fixiert und gegen GFP und Rad51 gefärbt. G2-Phase-Zellen wurden durch Messung der EdU- und DAPI-Intensität identifiziert. Die Zellkerne wurden mit einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen.

(B) Exemplarischer Western-Blot der Proteinexpression von exogenem GFP-Rad54 und endogenem (endo.) Rad54, Rad51 und Nek1 in den jeweiligen siRNA- und DNA-Plasmid-transfizierten Zellen. Exemplarisches Immunfluoreszenzbild von einer 1000-fach vergrößerten GFP-Rad54-S572A-exprimierenden G2-Phase Zelle, welche 8 h nach Röntgenbestrahlung GFP-Rad54-Foci aufweist.

(C,D) Zellen wurden mit den gekennzeichneten siRNAs und DNA-Plasmiden transfiziert. Bestrahlte (2Gy) G2-Phase-Zellen wurden identifiziert und deren DSB-Foci analysiert:

(C) Quantifizierung der Rad51-Foci (endogen) in GFP-Rad54-Foci-positiven G2-Phase-Zellen.

(D) Quantifizierung von Rad54-GFP-Foci (exogen) in G2-Phase-Zellen.

Dargestellt sind jeweils der Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Im Mittel wurden 30 Zellen pro Experiment ausgewertet. Die Kontrollwerte der jeweilig unbestrahlten Zellen wurden nicht subtrahiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. Der Signifikanzwert wurde mittels t-Test ermittelt. (***: $p < 0,001$)

Im Nek1-depletierten Hintergrund ist in GFP-Rad54-wt-komplementierten Zellen ein durchschnittliches Level von circa 16 Rad51-Foci zu detektieren. Die Depletion von Nek1 in GFP-Rad54-S572E-exprimierenden Zellen führt hingegen zu einer Anzahl von circa 10 Rad51-Foci pro Zelle (Abbildung 5.8 C). Dieses Ergebnis bedeutet, dass die E-Mutante im Nek1-defizienten Hintergrund vergleichbar effizient wie eine Wildtyp-Zelle repariert, und somit den Nek1-vermittelten DSB-Reparaturdefekt aufheben kann.

Neben der Anzahl der Rad51-Foci wurde ebenfalls die Anzahl der GFP-Rad54-Foci bestimmt. Das Ergebnis der Quantifizierung dieser Foci gleicht den Resultaten der Rad51-Foci-Analyse. So zeigen GFP-Rad54-S572A-exprimierende Zellen gegenüber der Wildtyp-Bedingung und GFP-Rad54-S572E-exprimierenden Zellen eine erhöhte Anzahl von GFP-Rad54-Foci. Im Nek1-depletierten Hintergrund zeigen GFP-Rad54-wt-Zellen ein erhöhtes und GFP-Rad54-S572E-exprimierende Zellen ein ähnliches Level von GFP-Rad54-Foci verglichen mit den Nek1-profizienten Kontrollzellen (Abbildung 5.8 D).

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel also nachgewiesen werden, dass Rad54 am Ser572 phosphoryliert vorliegen muss, damit die Reparatur von DSBs über HR effizient erfolgen kann. Der in der A-Mutante nachgewiesene Reparaturdefekt ist mit dem von Nek1-depletierten Zellen vergleichbar. Durch Integration der vorausgegangenen Ergebnisse, wie der Nek1-vermittelten Phosphorylierung von Rad54 *in vitro* und *in vivo* (siehe 5.3) kann weiter zusammengefasst werden, dass die Nek1-vermittelte Rad54-Phosphorylierung die effiziente Entfernung von Rad51 von der DNA fördert. Desweiteren weist die Persistenz von GFP-Rad54-wt-Foci in Nek1-defizienten Zellen ebenfalls auf eine Phosphorylierungs-abhängige Dissoziation der Rad54-Moleküle von der DNA hin.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die einzige Funktion von Nek1 während der HR auf der Phosphorylierung von Rad54 beruht, da in einem Nek1-defizienten Hintergrund der beobachtete HR-Defekt durch Komplementation mit der Rad54-E-Mutante, das heißt durch Imitation der Phosphorylierung am Serin572, aufgehoben werden kann.

Aufgrund der unbeeinträchtigten Rekrutierung der Rad54-Mutanten an den DNA-Schadensort, aber des gleichzeitig auftretenden Defektes in der Rad51-Dissoziation könnte man vermuten, dass frühe Rad54-Funktionen während der HR im Gegensatz zu späteren Funktionen unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des Rad54-Proteins ablaufen. Somit könnte die Phosphorylierung am Ser572 ein wichtiges regulatorisches Element bei der Unterscheidung zwischen frühen und späten Rad54-Funktionen darstellen. Rad54 besitzt ein facettenreiches Funktionsspektrum während der HR und einige dieser Eigenschaften beschreiben sogar gegenläufige Funktionen. So stabilisiert Rad54 in frühen Schritten der HR das Rad51-Nukleoproteinfilament und unterstützt die Ausbildung von D-Loops sowie deren Stabilität. Während der späten HR-Schritte besitzt Rad54 dagegen bei der Entfernung von Rad51 von der Heteroduplex-DNA genau entgegengesetzte Funktionen (Solinger et al., 2002). Diese Beobachtungen bestärken also die Vermutung, dass Rad54 aufgrund seiner diversen

Funktionen einer Regulation während der HR unterliegen muss, und die Phosphorylierung am Ser572 könnte diese Funktionen separieren.

5.4.2 Mobilitätsstudien mit Rad54-Mutanten

Da GFP-Rad54-S572A-exprimierende Zellen gegenüber der GFP-Rad54-S572E-Mutante eine erhöhte Anzahl von GFP-Rad54-Foci aufweisen (siehe 5.4.1), stellte sich die Frage ob die Rad54-Phosphorylierung am Serin572 die Mobilität der Rad54-Proteine am DNA Schaden verändert. Um die relative Mobilität oder die Verweildauer von Proteinen an bestimmten Strukturen, wie zum Beispiel an DSBs zu messen, wurden FRAP (*Fluorescence-Recovery-After-Photobleaching*)-Experimente durchgeführt (siehe 4.3).

Hierzu wurden HeLa-S3-Zellen mit den Rad54-siRNA-resistenten Plasmiden GFP-Rad54-wt, GFP-Rad54-S572A, GFP-Rad54-S572E oder GFP-Rad54-K189A (ATPase-inaktiv) transfiziert und endogenes Rad54-Protein mittels siRNA depletiert. Die Herunterregulation von endogenem Rad54 sowie die Proteinexpression der GFP-Rad54-Mutanten wurde mittels Western-Blot überprüft (Abbildung 5.9 A). Vor den FRAP-Messungen wurden die Zellen zunächst mit einer Dosis von 4 Gy mit Röntgenstrahlen bestrahlt. 7 h später wurden die GFP-Chromophore eines einzelnen GFP-Rad54-Fokus durch Laserstrahlung ausgebleicht (Abbildung 5.9 B). Anschließend wurde die wiederkehrende Fluoreszenzintensität des GFP-Rad54-Fokus in Intervallen von 392 ms über einen Gesamtzeitraum von 20 s gemessen. Die jeweiligen FRAP-Kurven wurden aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten wie unter 4.3.1 beschrieben erstellt.

In Abbildung 5.9 B ist zu erkennen, dass die zurückkehrende Fluoreszenzintensität der GFP-Rad54-wt-Foci und der GFP-Rad54-S572E-Foci einen ähnlichen Verlauf zeigen. Beide Kurven erreichen nach dem Ausbleichen einen Plateau-Wert der mittleren Fluoreszenzintensität von circa 90 % bezogen auf die mittlere Fluoreszenzintensität vor dem Ausbleichen. Im Gegensatz dazu nimmt die Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität von GFP-Rad54-K189A- und GFP-Rad54-S572A-Foci einen anderen Verlauf und erreicht nach dem Ausbleichvorgang ein Maximum der relativen Fluoreszenzintensität von circa 75 % (Abbildung 5.9 B). Dies bedeutet, dass circa 15 % der GFP-Rad54-Foci in der S572A- oder der K189A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp oder zur S572E-Mutante eine höhere Immobilität am DNA-Schaden aufweisen.

Die Punktmutation von Lysin189 zu Alanin bewirkt eine Dysfunktion der ATPase-Aktivität von Rad54. Mit dieser Mutante konnte bereits in früheren FRAP-Experimenten ein Unterschied zum Rad54-wt beschrieben werden (Agarwal et al., 2011). Bei dieser Studie kehrte die Fluoreszenzintensität nach dem Ausbleichen von GFP-Rad54-wt-Foci auf einen Plateauwert von circa 75 % und bei GFP-Rad54-K189A-Foci auf circa 65 % der Ausgangsintensität zurück. Es konnte also

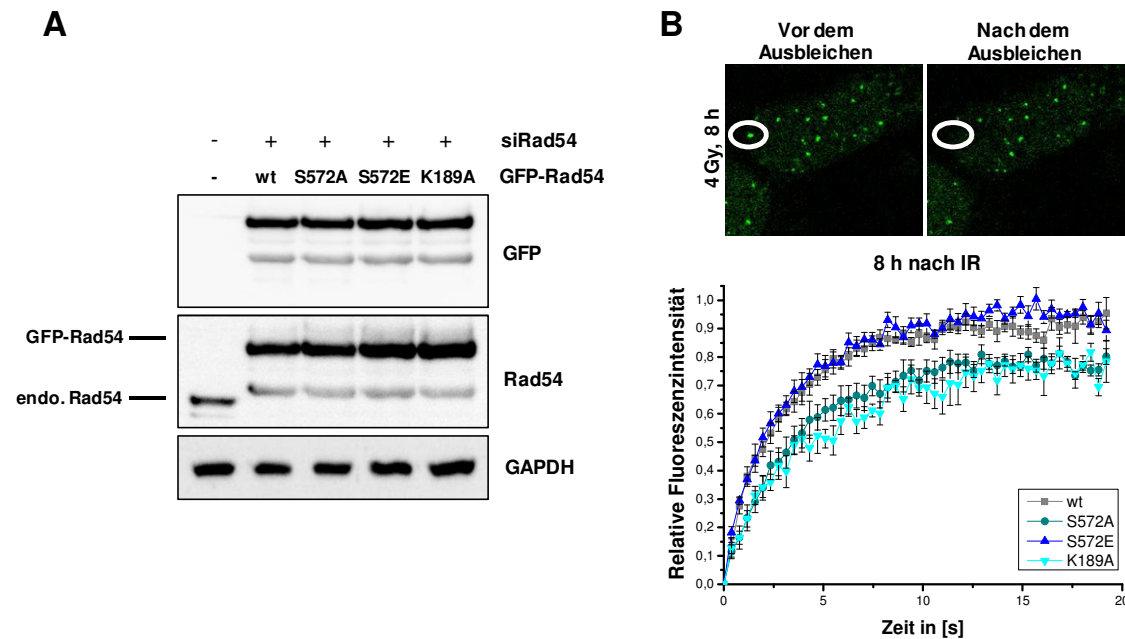


Abbildung 5.9: FRAP-Experimente zur Untersuchung der Mobilität von Rad54-Mutanten

- (A) Exemplarischer Western-Blot zur Proteinexpression von exogenem GFP-Rad54 und endogenem Rad54 in mit siRNA- und DNA-Plasmid-transfizierten (GFP-Rad54-wt, -S572A, -S572E oder -K189A) HeLa-S3-Zellen.
- (B) FRAP-Kurven der jeweiligen Rad54-Mutanten. Die Kurven wurden durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität in Zeitintervallen von 398 ms vor und nach dem Ausbleichen der jeweiligen GFP-Rad54-Foci (bzw. GFP-Chromophore) errechnet. Die transfizierten Zellen wurden zuvor mit 4 Gy bestrahlt, sodass 7 h später GFP-Rad54-Foci nachgewiesen werden konnten. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Gesamtzahl der gemessenen Foci beträgt für GFP-Rad54-wt $n=87$, GFP-Rad54-S572A $n=80$, GFP-Rad54-S572E $n=74$ und GFP-Rad54-K189A $n=58$. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte.

ähnlich wie in dieser Arbeit eine höhere immobile Fraktion von zusätzlichen 10 % in der ATPase-defekten Rad54-Mutante im Vergleich zum Rad54-wt detektiert werden. Die Tatsache, dass die Gesamtwerte in der genannten Studie auf einem etwas niedrigerem Niveau liegen, kann auf technische Parameter wie die Laserintensität, Ausbleichdauer oder etwa auf den unterschiedlichen Modellorganismus (Mauszellen) zurückgeführt werden.

Agarwal *et al.* zeigten weiterhin, dass die ATPase-defekte Mutante einen Reparaturdefekt auf Rad51- und Rad54-Foci Ebene zu späten Reparaturzeiten aufweist, während die Ausbildung der Rad54-Foci nicht beeinträchtigt ist. Diese Beobachtung ist mit dem in dieser Arbeit detektierten Rad51- und Rad54-Dissoziationsdefekt der S572A-Mutante vergleichbar. Sowohl die K189A- als auch die S572A-Mutante weisen also in FRAP-Analysen eine eingeschränkte Mobilität am DNA-Schaden auf, was durch das Persistieren ihrer Rad54-Foci am DNA-Schaden untermauert wird (siehe 5.4). Desweiteren verhält sich die S572E-Mutante, mit der dauerhaft imitierten

Phosphorylierung, wie Rad54-wt-Zellen. Dies setzt voraus, dass Rad54 *in vivo* ebenfalls permanent phosphoryliert vorliegt oder eben erst phosphoryliert wird, wenn dies benötigt wird. Diese Frage soll im folgenden Kapitel genauer untersucht werden

5.5 Zeitlicher Verlauf der Rad54-Phosphorylierung

Die in Kapitel 5.4.1 und 5.4.2 durchgeführten Analysen der Rad54-Mutanten deuten darauf hin, dass der Phosphorylierungsstatus von Rad54 dessen Mobilität sowie die effiziente Reparatur von DSBs beeinflusst. In diesem Kapitel soll nun charakterisiert werden in welchem zeitlichen Verlauf die Phosphorylierung von Rad54 nach DNA-Schadensinduktion auftritt.

Hierzu wurden zunächst HeLa-S3-Zellen mittels doppeltem Thymidinblock synchronisiert (siehe 4.5). Es sollten synchronisierte G2-Phase-Zellen untersucht werden, da aus den vorherigen Ergebnissen bekannt war, dass die Rad54-Phosphorylierung in der G2-Phase eine Funktion besitzt. Desweiteren sollten mögliche Störeffekte bedingt durch Replikation, Mitose oder Zellzyklusarreste ausgeschlossen werden. 8 h nach dem Entlassen der Zellen aus dem Thymidinblock befanden sich diese in der G2-Phase und wurden mit 10 Gy bestrahlt. Nach verschiedenen Reparaturzeiten wurden die Zellen geerntet, Zellkernextrakte (KE) hergestellt und mittels Western-Blot analysiert. Der zeitliche Ablauf der Zellsynchronisation sowie die Überprüfung mittels Durchflusszytometrie ist in Abbildung 5.10 A dargestellt. Durch die Quantifizierung der Zellzahl in den jeweiligen Zellzyklusphasen konnte ermittelt werden, dass zum Zeitpunkt der Bestrahlung (8 h nach doppeltem Thymidinblock) circa 80 % der Zellen in der späten S- oder der G2-Phase synchronisiert waren.

Bei der Untersuchung der Phosphorylierung von Rad54 in der G2-Phase ist zu beobachten, dass das pRad54-Signal mit zunehmender Reparaturzeit ansteigt, während die Gesamtmenge von Rad54 gleich bleibt (Abbildung 5.10 B). 8 h nach Bestrahlung ist das stärkste pRad54-Signal zu detektieren. Analog dazu nimmt das Proteinniveau von Nek1 während der Reparaturzeit ebenfalls zu, wobei das Signal zwischen 2 und 8 h auf etwa gleich hohem Niveau bleibt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert. Um eine mögliche Zellzyklusphasenverschiebungen auszuschließen, wurde zusätzlich der S-/G2-Zellzyklusmarker Cyclin A verwendet (Abbildung 5.10 B).

Die spät auftretende Phosphorylierung von Rad54 könnte womöglich durch eine Hyperphosphorylierung von Rad54 in der Mitose zustande kommen. Um dies auszuschließen, wurde das pRad54-Signal von mitotischen Zellen mittels Western-Blot untersucht. Hierzu wurde 6 und 12 h (+/- Nocodazol) nach dem Entlassen der Zellen aus dem Thymidinblock der Mitosemarker pH3 bzw. der S-/G2-Phase-spezifische Marker Cyclin A nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, in der die Zellen durch Zugabe von Nocodazol in der Mitose angesammelt wurden.

6 h nach dem Thymidinblock zeigen die synchronisierten Zellen eine maximale Proteinexpression von Cyclin A, da die Zellen nach dem Ende des zweiten Thymidinblocks vom frühem S-Phase-Arrest entlassen wurden und in die S-/G2-Phase progressieren konnten. Weitere 6 h später (12 h nach Thymidinblock) ist nur ein Hintergrundsignal von Cyclin A zu erfassen, da sich die meisten Zellen in der Mitose oder bereits in der G1-Phase befinden. Dies bestätigt sich, da 12 h nach Thymidinblock das Mitose-typische pH3-Signal zu detektieren ist. Wenn die Zellen zusätzlich zwischen 10 und 12 h nach Thymidinblock mit Nocodazol behandelt wurden, ist ein entsprechend höheres Level von pH3 zu erkennen, da die Zellen in der Mitose arretiert wurden. Das GAPDH-Proteinniveau wurde als Ladekontrolle verwendet (Abbildung 5.10 C).

Die pRad54- und Nek1-Proteinlevel zeigen 6 h nach Thymidinblock, wenn sich die Zellen in der S-/G2-Phase befinden, das stärkste Signal (Abbildung 5.10 C). 12 h nach Thymidinblock bzw. nach Nocodazolbehandlung, wenn sich die Zellen in der G1-Phase oder Mitose befinden, liegt das pRad54- bzw. Nek1-Signal dagegen reduziert vor (Abbildung 5.10 C). Dies bedeutet, dass Rad54 Zellzyklusphasen-spezifisch in der S-/G2-Phase, aber nicht in der M/G1-Phase phosphoryliert wird.

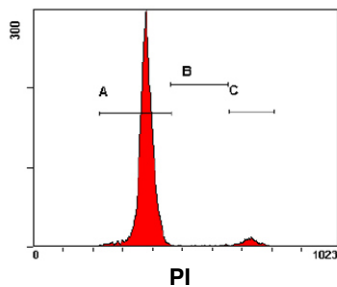
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Rad54 zwischen 4 und 8 h nach Bestrahlung in der G2-Phase phosphoryliert wird. Es kann außerdem ausgeschlossen werden, dass das Rad54-Phosphorylierungssignal in mitotischen Zellen generiert wird.

Die HR ist ein hochgradig regulierter Mechanismus und Rad51 zusammen mit Rad54 sind an einem Großteil der einzelnen Schritte beteiligt (Krejci et al., 2012; Peterson et al., 2013). Es wurde bisher nicht verstanden wie Rad54 solch ein diverses Spektrum an unterschiedlichen Funktionen während der einzelnen HR-Schritte abdecken kann. Es war jedoch klar, dass Rad54 stark reguliert werden muss, um die verschiedenen Funktionen zum richtigen Zeitpunkt ausüben zu können (Heyer et al., 2006). Die identifizierte Phosphorylierung am Serin572 könnte in diesem Zusammenhang als molekularer Schalter dienen, welcher eventuell verschiedene Rad54-Funktionen regulieren kann und somit zur Separierung unterschiedlicher Rad54-Funktionen führen könnte. Es ist wahrscheinlich, dass neben Nek1 noch weitere Kinasen oder andere Enzyme das Protein Rad54 post-translational modifizieren können, um somit dessen Funktionen zu steuern. Es wurde beispielsweise in *S. cerevisiae* gezeigt, dass die meiotische Kinase Mek1 Rad54 am Threonin132 phosphoryliert, was zu einer Abschwächung der Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 führt (Niu et al., 2009). Desweiteren wurde berichtet, dass Rad54 in *S. pombe* ubiquitinyliert werden kann, was auf weitere regulierende Mechanismen hindeutet (Trickey et al., 2008).

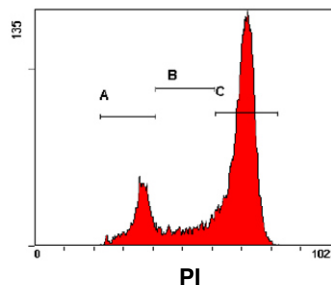
A

16 h Thymidin → 10 h Inkubation ohne Thymidin → 14 h Thymidin → 8 h Inkubation ohne Thymidin → 10 Gy → 0,5 – 8 h Inkubation ohne Thymidin

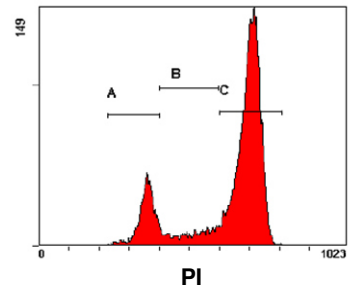
0 h nach doppeltem Thymidinblock



8 h nach doppeltem Thymidinblock

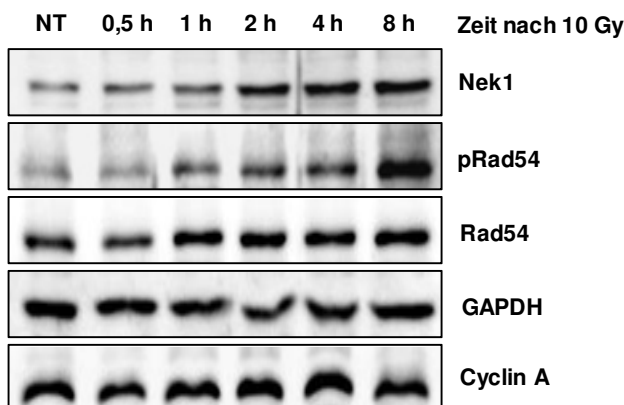


8 h nach 10 Gy



B

KE von synchronisierten G2-Phase Zellen



C

Zeit nach Thymidinblock:

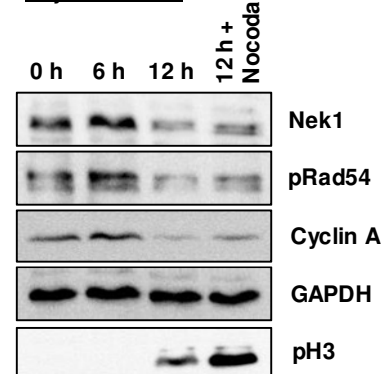


Abbildung 5.10: Kinetik der Rad54-Phosphorylierung in der G2-Phase nach Röntgenbestrahlung

(A) Zeitliche Abfolge des doppelten Thymidinblocks und repräsentative durchflusszytometrische Messungen (PI-FACS) von HeLa-S3-Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Synchronisation des Zellzyklus wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (*Gate A* = G1-Phase, *Gate B* = S-Phase, *Gate C* = G2-Phase).

(B) Kinetik der Proteinexpression von Nek1, pRad54 und Kontrollproteinen in synchronisierten G2-Phase-Zellen. Synchronisierte Zellen wurden 8 h nach Entlassen aus dem doppelten Thymidinblock mit 10 Gy bestrahlt und zu den indizierten Reparaturzeitpunkten geerntet, Kernextrakte (KE) hergestellt und diese mittels Western-Blot analysiert.

(C) Proteinexpression von Nek1, pRad54, Cyclin A und pH3 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen der HeLa-S3-Zellen aus dem doppelten Thymidinblock. Eine Probe wurde zusätzlich zwischen 10 und 12 h mit Nocodazol behandelt. Es sind Gesamtzellextrakte gezeigt.

Western-Blots wurden in drei unabhängigen Experimenten wiederholt und bestätigt. Es sind repräsentative Blots eines Experimentes gezeigt.

5.6 Interaktionsstudien zwischen Rad51 und Rad54

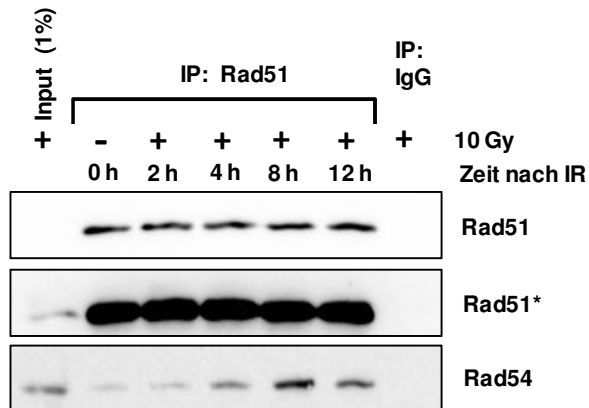
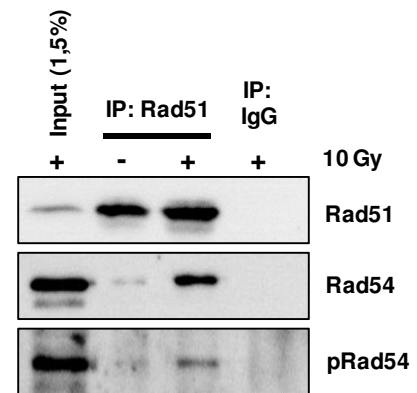
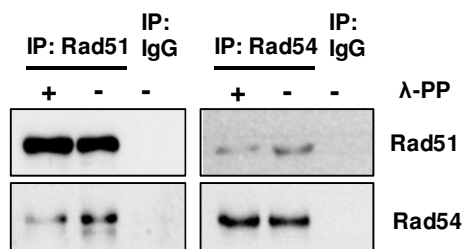
Wie schon in Kapitel 5.2 gezeigt werden konnte, interagieren die DSB-Reparaturproteine Rad51 und Rad54 nach Bestrahlung. Es soll nun in Analogie zu Kapitel 5.5 der zeitliche Verlauf dieser Interaktion in der G2-Phase genauer charakterisiert werden. Dazu wurden erneut HeLa-S3-Zellen mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert und mit 10 Gy bestrahlt (siehe 4.5). Zu verschiedenen Reparaturzeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und die Interaktion beider Proteine mittels Immunpräzipitationen von endogenem Rad51 und anschließender Western-Blot-Analyse von Rad51 und Rad54 untersucht.

In Abbildung 5.11 A ist zu erkennen, dass bei gleicher Menge von immunpräzipitierten Rad51 zwischen 2 und 8 h nach Bestrahlung ein kontinuierlicher Anstieg von ko-immunpräzipitiertem Rad54 zu detektieren ist. Zwischen 8 und 12 h nimmt die Menge an Rad54 wieder ab. Demzufolge ist 8 h nach Bestrahlung die Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 in der G2-Phase am stärksten ausgeprägt.

Da die Phosphorylierung von Rad54 am Serin572 nach Bestrahlung in der G2-Phase eine ähnliche Kinetik wie die Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 aufweist, stellte sich die Frage, ob die zeitlich regulierte Interaktion von der Rad54-Phosphorylierung am Serin572 abhängig ist. Um dieser Frage nachzugehen, sollte zunächst untersucht werden, ob pRad54 im Immunkomplex von Rad51/Rad54 vorhanden ist. Hierzu wurden erneut HeLa-S3-Zellen mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert und mit 10 Gy bestrahlt. 8 h nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und endogenes Rad51 immunpräzipitiert. Durch anschließende Western-Blot-Analyse wurden die Proteinniveaus von Rad51, Rad54 und pRad54 ermittelt.

Nach der Immunpräzipitation von Rad51 aus Kernextrakten bestrahlter Zellen, ist ein deutliches Proteinlevel von pRad54 sowie von Rad54 zu detektieren (Abbildung 5.11 B). Phosphoryliertes Rad54 liegt somit in einem Immunkomplex mit Rad51 vor. In unbestrahlten Zellen ist dagegen nach Rad51-Immunpräzipitation nur ein Hintergrundlevel von Rad54 und pRad54 zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Komplexbildung von Rad51 und Rad54 durch die Phosphorylierung von Rad54 gefördert oder stabilisiert wird und DNA-Schadensinduziert auftritt.

Um diese Annahme zu überprüfen, sollte die Interaktion von Rad51 und Rad54 nach Phosphatasebehandlung untersucht werden. Hierfür wurden in der G2-Phase synchronisierte HeLa-S3-Zellen mit 10 Gy bestrahlt, nach 8-stündiger Reparaturzeit geerntet und Zellkernextrakte hergestellt. Nach Immunpräzipitationen von Rad51 oder Rad54 mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine mit Phosphatase behandelt. Abbildung 5.11 C zeigt, dass nach Phosphatasebehandlung von immunpräzipitierten Rad51 bzw. Rad54 weniger ko-immunpräzipitiertes Rad54 bzw. Rad51 vorliegt als nach Mock-Behandlung. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme einer Stabilisierung des Rad51/Rad54-Komplexes durch Phosphorylierungen von Rad54.

AKE von synchronisierten G2-Phase Zellen**B**KE von synchronisierten G2-Phase Zellen**C**8 h nach 10 Gy**Abbildung 5.11: Interaktionsstudien von Rad51 und Rad54**

(A) HeLa-S3-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert, mit 10 Gy bestrahlt und nach unterschiedlichen Reparaturzeiten geerntet, Zellkernextrakte (KE) hergestellt und daraus Rad51 immunpräzipitiert. Rad51 und Rad54 wurden mittels Western-Blot detektiert.

(* = stärker belichtet)

(B) HeLa-S3-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert und mit 10 Gy bestrahlt. 8 h nach Röntgenbestrahlung wurden die Zellen geerntet. Von unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurden Kernextrakte (KE) hergestellt, Rad51 immunpräzipitiert und die Proteine Rad51, Rad54 sowie pRad54 mittels Western-Blot-Analyse detektiert.

(C) HeLa-S3-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert und mit 10 Gy bestrahlt, 8 h später geerntet und Zellkernextrakte (KE) hergestellt. Rad51 oder Rad54 wurde immunpräzipitiert und anschließend mit λ -Phosphatase (λ -PP) behandelt. Zur Proteinanalyse wurden Rad51- und Rad54-Proteinlevel mittels Western-Blot untersucht.

Zur Kontrolle wurde für jedes IP-Experiment anstatt des spezifischen Antikörpers unspezifisches IgG-Serum eingesetzt. Western-Blots wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten wiederholt und bestätigt. Es sind repräsentative Blots eines Experimentes gezeigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Komplexbildung von Rad51 und Rad54 nach Bestrahlung einer zeitlichen Kinetik folgt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Rad54 in diesem Komplex vorhanden ist und die Stabilität dieses Komplexes von seinem Phosphorylierungsstatus abhängig ist. Es wurde bereits in früheren Immunpräzipitationsstudien gezeigt, dass Rad51 und Rad54 DNA-schadensabhängig miteinander wechselwirken und einen Komplex bilden (Srivastava et al., 2009; Tan et al., 1999). Es konnte jedoch nun zum ersten Mal in diese Arbeit gezeigt werden, dass diese Komplexbildung nach Bestrahlung einem charakteristischen zeitlichen Verlauf, mit einer maximalen Ausprägung 8 h nach DNA-Schadensinduktion, unterliegt. Man kann davon ausgehen, dass die HR 8 h nach Bestrahlung mit 10 Gy sehr weit fortgeschritten ist. Diese Annahme kann aus Analysen von zeitlich gut aufgelösten Rad51-Foci Kinetiken geschlussfolgert werden (Beucher et al., 2009). Nach diversen *in vitro* Studien geht man jedoch davon aus, dass Rad51 schon zu frühen Schritten der HR mit Rad54 interagiert (Kwon et al., 2007; Li et al., 2007; Wolner et al., 2003). Diese Schlussfolgerungen beruhen allerdings nicht auf Untersuchungen von Rad51/Rad54-Komplexen, sondern sind vielmehr eine Interpretation aus der Beobachtung, dass Rad54 und Rad51 gegenseitig ihre motorische ATPase-Funktion stimulieren können. Für solche Wechselwirkungen müssen allerdings keine stabilen Protein-Komplexe gebildet werden, sondern schwache und transiente Interaktionen sind hierfür ausreichend (Perkins et al., 2010). Die in dieser Arbeit beobachtete *in vivo* Interaktions-Kinetik unterstreicht desweiteren die Hauptfunktion von Rad54, nämlich die Entfernung von Rad51 von der DNA. Das Interaktionsmaximum tritt zu einem Zeitpunkt auf, an dem die Rad51-Moleküle von der DNA entfernt werden. Es wurde bereits in einigen Studien geschlussfolgert, dass Rad54 mit Rad51 interagieren muss, damit Rad51 aktiv durch Rad54 von der DNA entfernt wird (Solinger et al., 2002).

Desweiteren stimmt das zeitliche Maximum der Interaktion von Rad54 mit Rad51 mit der Zeitspanne des beobachteten Phosphorylierungsmaximums von Rad54 perfekt überein (siehe 5.5). Es ist also gut vorstellbar, dass die Rad54-Phosphorylierung die Komplexbildung mit Rad51 fördert. Die Abschwächung der Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 nach Dephosphorylierung weist zudem auf eine Stabilisierung des Komplexes durch Phosphorylierungen hin. Jedoch kann mit diesem Experiment keine Aussage darüber getroffen werden, um welche Phosphorylierung es sich handelt. So ist bekannt, dass auch Rad51 von diversen Kinasen an einigen Stellen phosphoryliert werden kann (Flott et al., 2011; Popova et al., 2009; Yuan et al., 1998). Diese Phosphorylierungen könnten ebenfalls Komplex-fördernd oder -schwächend auf den Rad51/Rad54-Komplex einwirken. Über den spezifischen Einfluss der Rad54-Phosphorylierung am Serin572 lassen sich aus diesem Experiment kaum Rückschlüsse ziehen. Es ist deshalb sinnvoller die Rad51/Rad54-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Rad54-Phosphorylierung am Serin572 zu untersuchen.

5.7 Interaktionsstudien zwischen Rad54 und Rad51 in Abhängigkeit der Phosphorylierung von Rad54 am Ser572

In diesem Kapitel soll abschließend der Einfluss der Rad54-Phosphorylierung am Ser572 auf die Komplexbildung zwischen Rad54 und Rad51 untersucht werden. Da aus Kapitel 5.3 bekannt ist, dass die Phosphorylierung am Serin572 nach Nek1-Depletion stark verringert ist, wurde die Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 in Nek1-defizienten und -profizienten Zellen miteinander verglichen. Hierfür wurden synchronisierte G2-Phase-Zellen mit 10 Gy bestrahlt, die Zellen nach 8-stündiger Reparaturzeit geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und Immunpräzipitationen von Rad51 mit anschließender Western-Blot-Analyse von Rad51 und Rad54 durchgeführt. Das endogene Nek1-Proteinniveau wurde mittels shRNA herunterreguliert. Die Synchronisierung in der G2-Phase von NS- und shNek1-1-Zellen durch einen doppelten Thymidinblock wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert und ist in Abbildung 5.12 A dargestellt. Durch die Quantifizierung der Anzahl von NS- und shNek1-1-Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen konnte ermittelt werden, dass zum Zeitpunkt der Bestrahlung (8 h nach doppeltem Thymidinblock) circa 80 % der jeweiligen Zellen in der späten S- oder der G2-Phase synchronisiert waren. In Abbildung 5.12 B ist zu erkennen, dass Nek1-profiziente Zellen nach Immunpräzipitation von Rad51 ko-immunpräzipitiertes Rad54 aufweisen. In Nek1-defizienten Zellen ist dagegen kein Rad54-Signal zu detektieren, was darauf hindeutet, dass die Interaktion zwischen Rad51 und Rad54 in der G2-Phase Nek1-vermittelt auftritt.

Diese Interaktionsstudie sollte ebenfalls in der Zelllinie Hek293 überprüft werden. Da diese Zelllinie in der G2-Phase nicht gut zu synchronisieren ist, wurde das Experiment mit asynchronen Zellen durchgeführt. Hek293-Zellen wurden mit Kontroll- oder Nek1-siRNA behandelt, 48 h später mit 10 Gy bestrahlt und nach 8-stündiger Reparaturzeit geerntet. Aus den hergestellten Zellkernextrakten wurde Rad51 immunpräzipitiert und anschließend Rad51 und Rad54 in Immunkomplexen mittels Western-Blot analysiert. Auch in asynchronen Hek293-Zellen konnte gezeigt werden, dass siCtrl-behandelte Zellen ko-immunpräzipitiertes Rad54 nach Rad51-Immunpräzipitation aufweisen, jedoch ist kaum ko-immunpräzipitiertes Rad54 in Nek1-depletierten Zellen zu detektieren (Abbildung 5.12 C). Es konnte somit in einer weiteren Zelllinie bestätigt werden, dass die Komplexbildung von Rad51 und Rad54 *in vivo* von Nek1 abhängig ist.

Um die Abhängigkeit der Rad54-Phosphorylierung am Ser572 auf die Rad51/Rad54-Komplexbildung weiterführend zu untersuchen, wurden Hek293-Zellen mit den in Kapitel 5.4.1 beschriebenen GFP-Rad54-Konstrukten transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, nach 8-stündiger Reparaturzeit geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und die GFP-Rad54-Fusionsproteine mit einem spezifischen Antikörper gegen GFP präzipitiert. Die Ko-Immunpräzipitation von Rad51 wurde mittels Western-Blot analysiert.

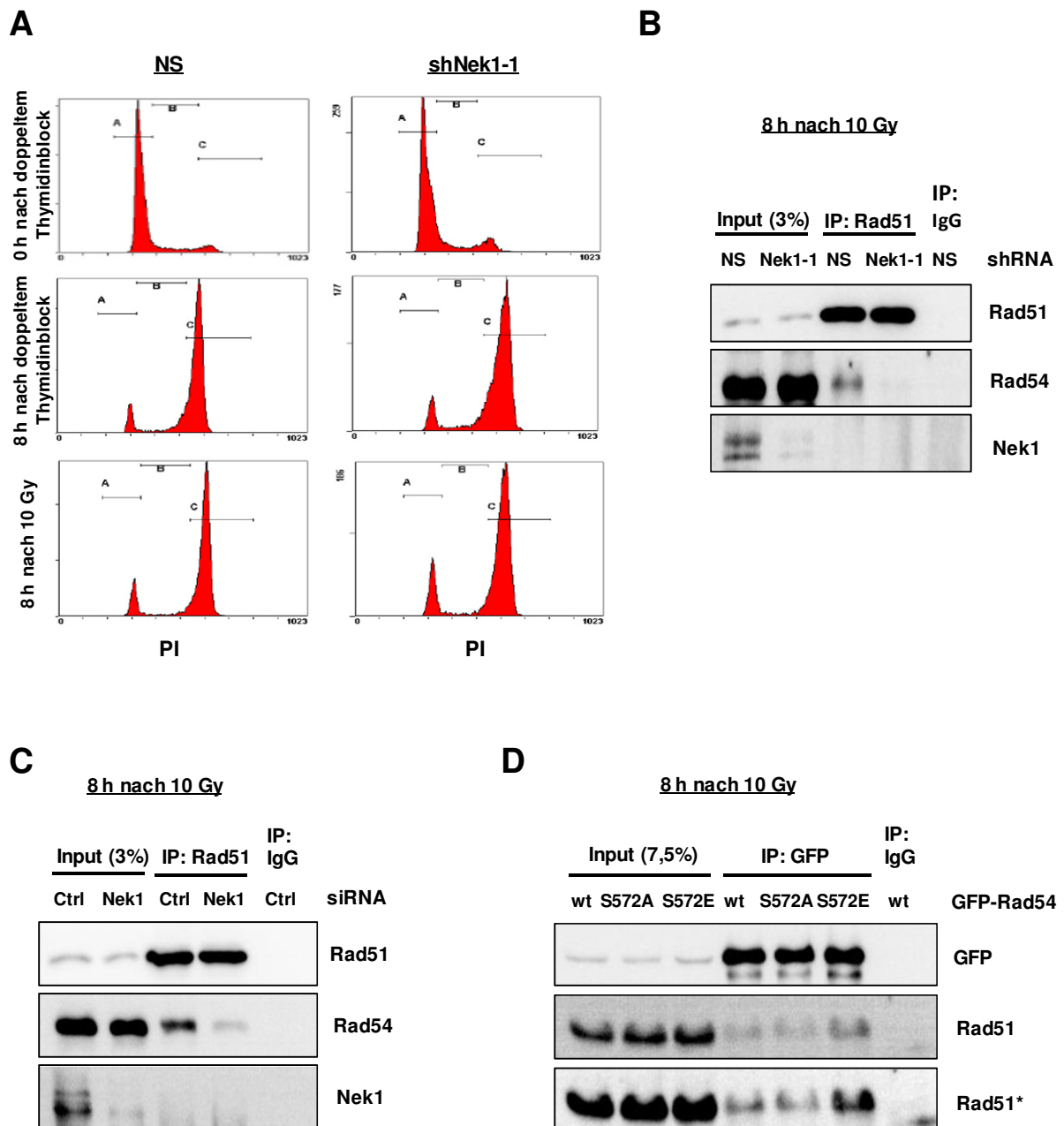


Abbildung 5.12: Komplexbildung von Rad54 mit Rad51 in Abhängigkeit von Nek1

- (A) Die Synchronisierung des Zellzyklus von NS- und shNek1-1-Zellen durch doppelten Thymidinblock wurde mittels Durchflusszytometrie (PI-FACS) zu den jeweiligen Zeitpunkten quantitativ überprüft (Gate A = G1-Phase, Gate B = S-Phase, Gate C = G2-Phase).
- (B) NS- und shNek1-1-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock in der G2-Phase synchronisiert, mit 10 Gy bestrahlt, 8 h später geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und Rad51 immunpräzipitiert. Die Proteinlevel von Nek1, Rad51 und Rad54 wurden mittels Western-Blot detektiert.
- (C) Asynchrone Nek1-profiziente (siCtrl) und -defiziente (siNek1) Hek293-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, 8 h später geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und Rad51 immunpräzipitiert. Die Proteinlevel von Nek1, Rad51 und Rad54 wurden mittels Western-Blot-Analyse detektiert.
- (D) Asynchrone Hek293-Zellen wurden mit den induzierten GFP-Rad54-Plasmiden transfiziert. Transfizierte Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, 8 h später geerntet, Zellkernextrakte hergestellt und GFP immunpräzipitiert. GFP- und Rad51-Proteinlevel wurden mittels Western-Blot untersucht. Zur Kontrolle wurde für jedes IP-Experiment anstatt des spezifischen Antikörpers unspezifisches IgG-Serum eingesetzt. Western-Blots wurden in mindestens zwei (B,D) oder drei (C) unabhängigen Experimenten wiederholt und bestätigt. Es sind repräsentative Blots eines Experimentes gezeigt.

Bei der Immunpräzipitation gleicher Proteinmengen von GFP-Rad54-S572E, GFP-Rad54-S572A oder GFP-Rad54-wt konnte bei GFP-Rad54-S572E circa 3 Mal mehr ko-immunpräzipitiertes Rad51 nachgewiesen werden (Abbildung 5.12 D). Demnach scheint die Imitation einer permanenten Rad54-Phosphorylierung am Ser572 die Interaktion zwischen Rad51 und GFP-Rad54 zu fördern.

Es ist allerdings verwunderlich, dass Rad54-wt und die E-Mutante nicht gleich stark mit Rad51 interagieren können. Da in Abbildung 5.12 B und C *in vivo* gezeigt werden konnte, dass die Komplexbildung von Rad51 und Rad54 von der Phosphorylierung am Ser572 abhängig ist, würde man eine ähnlich starke Interaktion vermuten, da die E-Mutante eine dauerhafte Phosphorylierung imitiert und Rad54-wt von Nek1 *in vivo* phosphoryliert werden kann (Abbildung 5.7 C). Die schwächere Interaktion von Rad54-wt mit Rad51 kann in diesem experimentellen Ansatz mit der Überexpression der GFP-Rad54-Proteine erklärt werden. Das Proteinlevel der Rad54-Mutanten bzw. von Rad54-wt lag im Vergleich zum endogenen Rad54 um ein Vielfaches (circa 30-50-fach) stärker exprimiert vor. Es ist deshalb zu vermuten, dass der enorme Überschuss von GFP-Rad54-wt in einem solchen überexprimierten System nicht effizient von Nek1 phosphoryliert werden kann und somit eine adäquate Komplexbildung von Rad51 mit Rad54 ausbleibt. Es ist bereits aus anderen Studien bekannt, dass in Wildtyp-Zellen post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen eng auf die jeweilige Proteinexpression abgestimmt sind, sodass Proteinlevel von Kinase und Substrat in einem bestimmten Verhältnis vorliegen müssen (Lopez-Maury et al., 2008). Konsequenterweise müssten also stabil transfizierte Zellen, welche physiologische Level von GFP-Rad54-wt exprimieren, eine gleich starke Interaktion mit Rad51 wie die E-Mutante aufweisen. Diese Vermutung kann durch die Foci-Experimente in Kapitel 5.4.1 unterstützt werden, da Rad54-wt und die E-Mutante den gleichen Phänotyp einer effizienten DSB-Reparatur aufzeigten, wenn physiologische Proteinlevel von GFP-Rad54-Proteinen exprimiert wurden.

In Abbildung 5.12 B und C konnte schließlich deutlich gezeigt werden, dass die Komplexbildung von Rad51 und Rad54 nur in Anwesenheit von Nek1 stattfinden kann. Dies deutet wiederum darauf hin, dass die Nek1-abhängige Rad54-Phosphorylierung am Ser572 die Interaktion verstärkt. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass Nek1 durch Phosphorylierungen die Komplexbildung zweier Proteine fördert. So phosphoryliert Nek1 die Sensorkinase ATR und fördert somit deren Interaktion mit ATRIP (Liu et al., 2013). Der ATR/ATRIP-Komplex hat während der HR wichtige Aufgaben bei der Initiierung von *Checkpoint*-Signalwegen, aber auch direkt bei der HR-abhängigen DSB-Reparatur (Chanoux et al., 2009). Solch eine Verstärkung der Proteininteraktion könnte auf eine direkte Konformationsänderung des phosphorylierten Proteins zurückzuführen sein und somit die Bindungsaffinität mit dem Partnerprotein erhöhen (Birck et al., 1999). Die Rad54-Phosphorylierung am Ser572 besitzt wie in Abbildung 5.12. B, C und D gezeigt wurde einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung des Rad51/Rad54-Komplexes. Es kann allerdings nicht postulieren, dass alleine die Rad54-Phosphorylierung am Ser572 die Interaktion mit Rad51 stabilisiert.

Dies könnte beispielsweise nur die erste Phosphorylierung in einer Reihe von Weiteren sein, welche in Abhängigkeit von phosphoryliertem Ser572 abfolgen könnte. Diese Annahme wird unterstützt, da solche Phosphorylierungskaskaden bereits bei anderen an der HR beteiligten Proteine, wie z.B. CtIP beschrieben wurden (Makharashvili et al., 2014). Um den alleinigen Stellenwert der Phosphorylierung am Ser572 weiterführend zu untersuchen, müssen *in vitro* Interaktionsstudien mit aufgereinigten, dephosphorylierten Rad54-Mutanten in Anwesenheit von Rad51 durchgeführt werden. In einem solchen Versuchsansatz könnte man unabhängig von weiteren *in vivo* Phosphorylierungen den direkten Einfluss der Phosphorylierung am Ser572 auf die Komplexbildung von Rad51/Rad54 untersuchen. Erste Hinweise auf einen dominanten Einfluss der Phosphorylierung von Ser572 auf die Komplexbildung von Rad51/Rad54 beschreibt bereits Abbildung 5.12 D. Aufgrund der starken Überexpression der GFP-Rad54-Proteine kann man post-translationale Phosphorylierungen an diesen Proteinen ausschließen, sodass dieses Experiment einen *in vitro*-ähnlichen Charakter aufweist. Die verstärkte Komplexbildung zwischen der E-Mutante und Rad51 verglichen mit der A-Mutante/Rad54-wt und Rad51 lässt somit einen dominanten Einfluss der Rad54-Phosphorylierung am Ser572 auf die Komplexbildung von Rad51/Rad54 vermuten.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Beschreibung des Modells

In diesem ersten Abschnitt der Diskussion sollen die gewonnen Erkenntnisse dieser Arbeit und weitere Resultate von Kooperationspartnern zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst etabliert werden, dass Nek1 an der Homologen Rekombination beteiligt ist, indem ein charakteristischer DSB-Reparaturdefekt auf γ H2AX- und Rad51-Foci-Ebene in Nek1-defizienten Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 5.3 und 5.4). Untermuert wurden diese Ergebnisse durch die erhöhte genomische Instabilität von Nek1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit typischen S-Phase-schädigenden Agenzien, welche DNA-Schäden generieren, die einer HR-spezifischen Reparatur unterliegen (Abbildung 5.1 und 5.2). Die Experimente wurden in humanen Patientenzellen sowie mit jeweils zwei unterschiedlichen Nek1-spezifischen si- oder sh-RNAs durchgeführt um die Spezifität der Nek1-Herunterregulation zu gewährleisten. Desweiteren konnte die Spezifität der Nek1-Depletion in Komplementationsstudien bestätigt werden (Abbildung 5.5). Zusätzlich wurde bei eigenen früheren Arbeiten in Nek1-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine reduzierte HR-Frequenz auf chromosomaler Ebene gemessen. Bestätigend zu diesen Beobachtungen konnten in der Arbeitsgruppe Löbrich von Dr. Olivia Barton mittels Plasmid-basierten *HR-Reporter-Assays* und mittels Messung der Rekombinations-assoziierten DNA-Synthese in Nek1-depletierten Zellen eine stark verringerte HR-Frequenz nachgewiesen werden. Neben der Beteiligung von Nek1 an der HR, konnte die genaue Funktion von Nek1 bei der HR beleuchtet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Rad54 mit Nek1 interagiert und von Nek1 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird (Abbildung 5.6 und 5.7). Desweiteren konnte die Nek1-abhängige Phosphorylierungsstelle von Rad54 am Ser572 identifiziert und die Notwendigkeit dieser Phosphorylierung für die DSB-Reparatur nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung hat insbesondere für die Entfernung von Rad51 von der DNA eine große Bedeutung (Abbildung 5.8). Um die Funktion dieser Rad54-Phosphorylierung bei der DSB-Reparatur genauer verstehen zu können, wurden weitere Foci-Studien und FRAP-Experimenten mit GFP-Rad54-Mutanten durchgeführt und dabei gezeigt, dass die Phosphorylierung am Ser572 für die Dynamik von Rad54 bzw. für dessen Mobilität am DNA-Schaden essentiell ist (Abbildung 5.8 und 5.9).

Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass die Rad54-Phosphorylierung am Serin572 einen wichtigen regulatorischen Mechanismus für die Komplexbildung mit Rad51 darstellt (Abbildung 5.11 und 5.12). Es ist zu vermuten, dass diese spät auftretende, Nek1-vermittelte Komplexbildung zwischen Rad51 und Rad54 die Rad51-Dissoziation von der DNA gewährleistet (Abbildung 5.10 und 5.12). Diese Annahme konnte durch Kooperation mit Prof. Dr. Wolf-Dietrich Heyer genauer analysiert werden, indem die DNA-Bindefähigkeit und die ATPase-Aktivität der aufgereinigten

Rad54-Phosphorylierungsmutanten *in vitro* untersucht wurden. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die E-Mutante gegenüber Rad54-wt bzw. der A-Mutante eine stark verminderte ATPase-Aktivität und eine stark reduzierte Fähigkeit zur DNA-Bindung besitzt. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle Ser572 in einer hochkonservierten ATPase-Domäne erklären, welcher zugleich eine Rolle für die Bindung an die DNA zugeschrieben ist (Thomä et al., 2005). So scheint die Rad54-Phosphorylierung am Ser572 die ATPase-Aktivität zu verringern und gleichzeitig die DNA-Bindung abzuschwächen. Dabei stehen wohl die DNA-Bindungsfähigkeit und die ATPase-Aktivität nicht in Abhängigkeit voneinander, denn es ist beschrieben, dass die ATPase-defekte Mutante Rad54-K189A keine Beeinträchtigung in der DNA-Binddefähigkeit aufweist (Agarwal et al., 2011; Swagemakers et al., 1998). Darüber hinaus ist die Phosphorylierungs-abhängige Änderung von gleichzeitig mehreren Funktionen bei Helikasen keine ungewöhnliche Beobachtung. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Helikase Mcm2 zu einer stärkeren DNA-Bindung und gleichzeitig zu einer reduzierten ATPase-Aktivität führt (Remus et al., 2005; Stead et al., 2011).

Bei genauerer Betrachtung und Zusammenfassung aller Experimente fällt auf, dass sich die Resultate von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten maßgeblich unterscheiden. In den genannten *in vitro*-Experimenten weisen nun Rad54-wt und A-Mutante den gleichen Phänotyp auf, während in den durchgeführten *in vivo*-Experimenten dieser Arbeit Rad54-wt und die E-Mutante den gleichen Phänotyp aufweisen (Tabelle 6.1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Rad54-wt *in vivo* von Nek1 phosphoryliert werden kann und somit die gleichen biochemischen Eigenschaften wie die E-Mutante aufweist. Im Gegensatz dazu liegt das aufgereinigte Rad54-wt-Protein in den *in vitro*-Studien nicht phosphoryliert vor und verhält sich deshalb biochemisch ähnlich wie die unphosphorylierbare A-Mutante. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus von Rad54-wt *in vitro* und *in vivo*, ergänzen sich die Resultate von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten dennoch sinnvoll. So unterstützen die *in vitro*-Studien zur DNA-Bindung die Resultate der FRAP-Experimente,

Tabelle 6.1: Übersicht aller Eigenschaften von Rad54-wt und den jeweiligen Mutanten.

	Assays	Rad54 wt	Rad54 S572A	Rad54 S572E	Rad54 K189A
<i>in vitro</i>	ATPase-Aktivität	ja	ja	nein	nein
	DNA-Bindung	ja	ja	nein	ja
<i>in vivo</i>	Rad51-Interaktion	ja	nein	ja	-
	HR-Reparatur	ja	nein	ja	nein
	Mobilität am DSB	ja	nein	ja	nein

welche *in vivo* durchgeführt wurden. Diese Studien deuten gemeinsam darauf hin, dass phosphoryliertes Rad54 gegenüber unphosphoryliertem Rad54 schwächer an die DNA bindet und dadurch eine höhere Mobilität am DSB aufweist. Es ist desweiteren nicht ungewöhnlich, dass die Phosphorylierung eines DNA-bindenden Proteins dessen DNA-Bindungsaffinität beeinflussen kann. So wurde beispielsweise für das Protein HMG-I nach Phosphorylierung durch cdc2 ebenfalls eine Reduktion der DNA-Bindefähigkeit beschrieben (Reeves et al., 1991). Alle gemessenen oder in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Rad54 und den untersuchten Mutanten sind zur Übersicht in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Die Phosphorylierung von Rad54 verursacht also auf mehreren Ebenen (Rad51-Interaktion, DNA-Bindung und ATPase-Aktivität) eine Funktionsänderung von Rad54 und kann somit als eine Art molekularer Schalter betrachtet werden. Da die Phosphorylierung von Rad54 erst zu späten Reparaturzeiten auftritt, können folglich die unterschiedlichen Rad54-Funktionen der frühen und späten HR-Schritte voneinander separiert und somit reguliert werden (Abbildung 5.10). Zusammengefasst kann folgendes Modell aufgestellt werden: Rad54 wird während später HR-Schritte von Nek1 am Ser572 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine stabile Komplexbildung zwischen Rad51 und Rad54. Da die DNA-Bindung und Translokationsaktivität entlang der DNA von phosphoryliertem Rad54 stark vermindert ist, dissoziiert Rad54 als Proteinkomplex zusammen mit Rad51 von der DNA. Nun kann die DNA-Synthese ablaufen und eine vollständige Reparatur des DNA-Schadens wird gewährleistet (Abbildung 6.1).

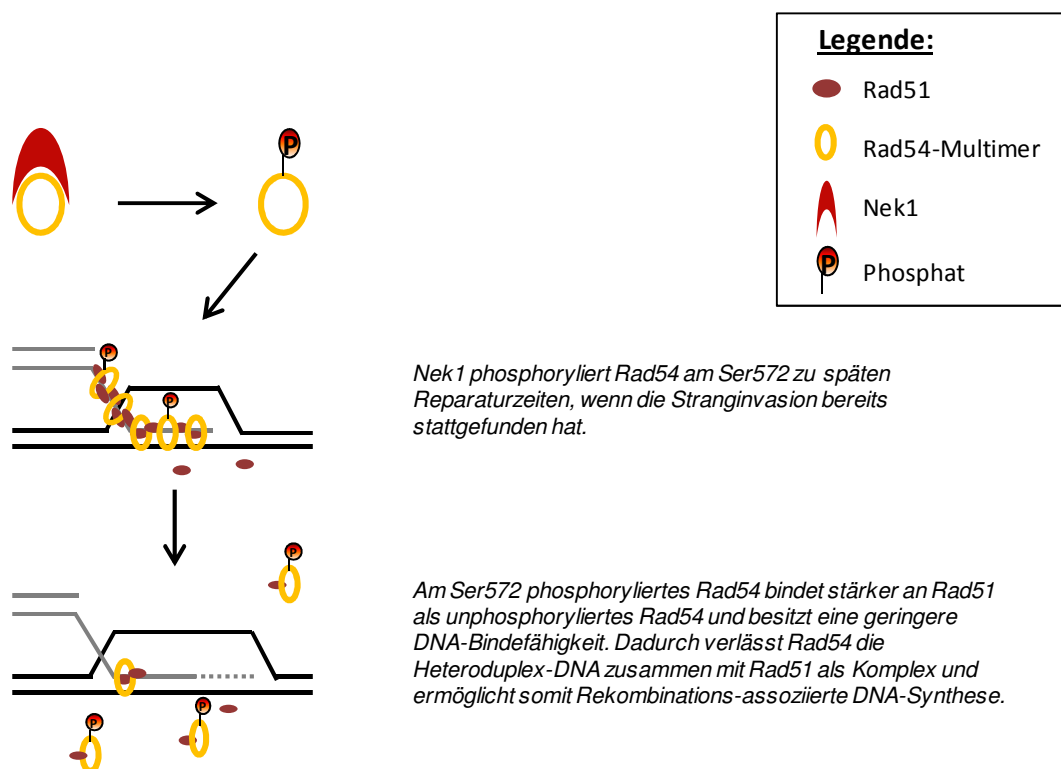


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Modells.

Die Nek1-vermittelte Rad54-Phosphorylierung am Serin572 erlaubt eine effiziente Rad51-Dissoziation von der Heteroduplex-DNA

6.2 Funktion von phosphoryliertem Rad54 bei der HR

6.2.1 Rolle der ATPase-Aktivität von phosphoryliertem Rad54 bei der Rad51-Dissoziation

Bei den meisten Schritten der HR ist ein Zusammenspiel von Rad51 und Rad54 sowie die gegenseitige Stimulierung ihrer ATPase-Aktivität beschrieben (Mazin et al., 2010). Am Ser572 phosphorylierte Rad54-Moleküle weisen nun eine Deaktivierung dieser ATPase-Aktivität und gleichzeitig eine verminderte DNA-Bindefähigkeit auf. Durch die verminderte DNA-Bindefähigkeit wird die lokale Konzentration von Rad54 am DNA-Schaden reduziert und auch die verminderte ATPase-Aktivität führt zu einer Inaktivierung der Translokationsfunktion von Rad54 (Ceballos and Heyer, 2011). Beide Mechanismen führen auf zwei unterschiedlichen Ebenen zu einem Abschalten der Rad54-Funktion am DNA-Schaden und stellen somit eine doppelte Absicherung dar.

Doch welche weitere Funktion könnte der Inaktivierung der ATPase-Domäne von Rad54 zugrunde liegen? Die Phosphorylierung von Rad54 bewirkt die stabile Komplexbildung mit Rad51, und somit die Rad51-Dissoziation von der DNA. Zusätzlich könnte ATPase-inaktives Rad54 die ATPase-Aktivität von Rad51 negativ beeinflussen und somit zur Deaktivierung der Rad51-Funktion führen. Da weiterhin bekannt ist, dass ATPase-defekte Rad51-Mutanten eine Beeinträchtigung in der DNA-Bindefähigkeit aufweisen, könnte dies die Dissoziation des Rad51/Rad54-Komplexes von der DNA zusätzlich fördern (Li et al., 2007). Demnach würde zum Ende der HR erneut ein doppeltes Abschalten auf Ebene der Rad51-Funktion postuliert werden können. Zum einen würde also die Komplexbildung mit phosphoryliertem Rad54 die Funktion von Rad51 bei der HR durch die Dissoziation von der DNA unterdrücken und zum anderen würde die Reduktion der Rad51-ATPase-Aktivität, vermittelt durch ATPase-inaktives Rad54, ebenfalls die Deaktivierung der Rad51-Funktion fördern. Als Resultat der Rad54-Phosphorylierung würden nach diesem Modell folglich inaktive und stabile Rad51/Rad54-Komplexe vorliegen, welche die Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese nicht weiter verhindern.

Diesem Erklärungsansatz widersprechen jedoch die bisherigen Modelle zu Rad54, die davon ausgehen, dass die ATPase-Aktivität von Rad54 nach der Bindung an Heteroduplex-DNA zusätzlich aktiviert wird. Dabei soll durch die ATPase-abhängige Translokation entlang der DNA die Wechselwirkung von Rad51 mit der DNA abgeschwächt werden, was wiederum zur Dissoziation von Rad51 führt (Ceballos and Heyer, 2011). Erst kürzlich konnte weiterführend gezeigt werden, dass der HR-Prozess der Stranginvasion und die Dissoziation von Rad51 als gleichzeitig ablaufende Prozesse zu verstehen sind, welche in Abhängigkeit von der Rad54-ATPase-Aktivität stattfinden. Nach diesem Modell pumpt Rad54 mittels dessen ATPase-Funktion die mit Rad51 beladene, einzelsträngige DNA in den homologen DNA-Bereich und streift dabei gleichzeitig Rad51 von der DNA ab (Wright and Heyer, 2014). Diese Beobachtungen beruhen allerdings weitestgehend auf *in vitro*-Experimenten und

berücksichtigen nicht die *in vivo*-Situation und somit nicht die post-translationale Modifikation der Proteine. Dennoch lassen sich die verschiedenen Modelle in Einklang bringen. Es wäre vorstellbar, dass Rad51 während der Stranginvasion nicht effizient genug von der DNA entfernt wird oder sich erneut an bestimmte Bereiche des D-Loops anlagert. Diese Annahme kann durch die Tatsache unterstützt werden, dass eine enorme Anzahl von Rad51-Molekülen als Fokus um den DSB lokalisiert sind, welche wahrscheinlich direkt wieder an das DNA-Substrat binden würden (Essers et al., 2002). Die Phosphorylierung von Rad54, welche in einem späten Zeitfenster der HR stattfindet, könnte nun die endgültige Entfernung der Rad51-Moleküle von der DNA katalysieren. Aufgrund der teilweise konträren Resultate sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um den Stellenwert der ATPase-Aktivität für die Rad54-Funktion während der Rad51-Dissoziation besser einordnen und differenzierter betrachten zu können.

6.2.2 Vergleich der Rad54-Funktionen zu frühen und späten HR-Schritten

Die zeitlich abhängige Phosphorylierung von Rad54 impliziert eine Funktionsänderung von Rad54 im Prozess der HR. Evolutionär hat solch ein Umschalten der Proteinfunktion den Vorteil, dass eine große Varianz von Funktionen bei einer kleinen Anzahl von Proteinen erreicht werden kann und somit energetisch günstig ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rad54-Phosphorylierung am Ser572 erst zu späten Zeiten nach Bestrahlung auftritt. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass diese Phosphorylierung essentiell für die Entfernung der Rad51-Moleküle von der DNA ist, indem die DNA-Bindefähigkeit von Rad54 reduziert wird und dann als Komplex zusammen mit Rad51 von der DNA dissoziieren kann. Da bei unphosphoryliertem Rad54 die DNA-Bindefähigkeit nicht beeinträchtigt ist, kann Rad54 bei frühen HR-Prozessen an die DNA binden und seinem Partnerprotein Rad51 assistieren. Dieses Modell steht jedoch im Widerspruch zu den DSB-Reparaturstudien der Rad54-E-Mutante aus Kapitel 5.4.1. Für diese Mutante konnte festgestellt werden, dass die permanente Phosphorylierung am Ser572 zu einer Wildtyp-ähnlichen HR-Reparatur führt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Rad54 für die DSB-Reparatur immer phosphoryliert vorliegen kann, ohne dessen Funktion bei frühen HR-Schritten zu beeinträchtigen. Das in dieser Arbeit aufgestellte Modell stützt sich allerdings ausschließlich auf eine Phosphorylierung von Rad54 zu späten Zeiten, um erst dann Rad51 von der DNA zu entfernen, wenn bereits die Stranginvasion stattgefunden hat. Dieses Modell würde also folglich eine andere Vorhersage zum Phänotyp eines dauerhaft phosphorylierten Rad54-Proteins treffen. So würde man konsequenterweise annehmen, dass die Rad51-Nukleoproteinfilamente während einer permanenten Rad54-Phosphorylierung am Ser572 zu frühen HR-Schritten destabilisiert werden, da phosphoryliertes Rad54 mit Rad51 stabile Komplexe bildet und folglich zur Dissoziation dieses Komplexes von der

DNA führt. Es sollten sich also überhaupt keine stabilen Nukleoproteinfilamente ausbilden können. Allerdings sollte man das vorliegende Modell um den Aspekt der Rad51-Regulation erweitern, was bislang nicht berücksichtigt wurde. Da Rad51 ebenfalls von mehreren Kinasen phosphoryliert werden kann, könnte eine dieser Phosphorylierungen von Rad51 ebenfalls zu späteren Zeiten der HR die stabile Interaktion mit Rad54 beeinflussen (Flott et al., 2011; Yuan et al., 1998). Würde man annehmen, dass eine späte Rad51-Phosphorylierung zusätzlich zur Rad54-Phosphorylierung am Ser572 für die späte Komplexbildung zwischen Rad51 und Rad54 benötigt wird, würde dies die beobachtete effiziente DSB-Reparatur der E-Mutante erklären, da eine zweite Abhängigkeit für die zeitliche Regulierung der Dissoziation des Rad51/Rad54-Komplexes bestehen würde.

Eine dauerhafte Rad54-Phosphorylierung während der HR würde konsequenterweise auch bedeuten, dass die ATPase-Funktion von Rad54 für frühe Schritte *in vivo* nicht essentiell ist, da die E-Mutante zumindest *in vitro* keine ATPase-Aktivität aufweist. Es wurde in früheren Studien tatsächlich herausgefunden, dass die ATPase-Funktion von Rad54 *in vivo* nicht für frühe HR-Schritte benötigt wird, wohl aber für den späten HR-Schritt der Dissoziation von Rad54- und Rad51-Molekülen von der DNA essentiell ist (Agarwal et al., 2011; Swagemakers et al., 1998). Dies konnte gezeigt werden, indem zeitlich aufgelöste *Live-cell*-Experimente nach Bestrahlung eine normale Ausbildung der Rad54-Foci zeigten, jedoch diese zu späten Zeiten persistierten und nicht aufgelöst werden konnten. Diese Daten wurden allerdings mittels der ATPase-defekten Rad54-K189A-Mutante erhoben, welche im Gegensatz zur S572E-Mutante sehr gute DNA-Bindefähigkeiten aufweist (Swagemakers et al., 1998). Es stellt sich nun die Frage, ob diese gute DNA-Bindefähigkeit der ATPase-defekten Rad54-K189A-Mutante deren Dissoziation von der DNA verhindert, und dadurch das Persistieren der Rad51- und Rad54-Foci erklärt werden kann. Aufgrund des in dieser Arbeit herausgearbeiteten Modells könnte man allerdings erwarten, dass Nek1 *in vivo* auch die ATPase-defekte Rad54-K189A-Mutante phosphorylieren kann und somit wie die E-Mutante von der DNA dissoziiert. Um diese kontroversen Erwartungen sowie die bereits beschriebenen Beobachtungen besser einordnen zu können, müsste man zunächst überprüfen, ob Nek1 überhaupt mit ATPase-defektem Rad54 interagieren und dieses am Ser572 phosphorylieren würde. Desweiteren könnte man das HR-Reparaturverhalten in einer ATPase-defekten Rad54-K189A-Mutante mit zusätzlich imitierter Phosphorylierung am Serin572 untersuchen (Rad54-K189A-S572E). Wenn eine solche Doppelmutante keinen Rad51-Dissoziationsdefekt aufzeigen würde, könnte man tatsächlich von einer Unabhängigkeit der ATPase-Aktivität bei Rad54-Funktionen in der HR ausgehen.

Die aktuelle Literatur zu Rad54 geht allerdings *in vitro* und *in vivo* von einer ATPase-abhängigen Rad54-Funktion bei der Rad51-Dissoziation von der DNA aus (Heyer et al., 2006; Mazin et al., 2010). Man kann nicht ausschließen, dass bereits bei der Rad54-vermittelten Stranginvasion durch die ATPase-Aktivität von Rad54 einige Rad51-Moleküle entfernt werden. Jedoch scheint die endgültige Rad54- und Rad51-Dissoziation vom DSB eher von deren Komplexbildung als alleine von der

Rad54-ATPase-Funktion abhängig zu sein. Unterstützend zu dieser Annahme konnte bei der BRCA2-vermittelten Rad51-Dissoziation von DNA-*Chickenfoot*-Strukturen in der S-Phase ein ähnlicher Mechanismus wie in dieser Arbeit postuliert werden. So stabilisiert BRCA2 zunächst die Rad51-Moleküle an der neu ausgebildeten *Chickenfoot*-Struktur. Durch eine CDK-abhängige Phosphorylierung an BRCA2 kann die Interaktion mit Rad51 reguliert werden, was wiederum die Stabilität der Rad51-Bindung an der DNA-*Chickenfoot*-Struktur beeinflusst und zur Dissoziation von Rad51 führen kann (Schlacher et al., 2011). Somit könnte es ebenfalls möglich sein, dass phosphoryliertes Rad54 die DNA-Bindung von Rad51 durch die Bildung von stabilen Komplexen regulieren kann. Für differenziertere Beschreibungen der Rad54-Funktion während der Rad51-Dissoziation sind jedoch in der Zukunft weitere Untersuchungen *in vivo* nötig.

6.3 Phosphorylierungsort von Rad54

In dieser Arbeit konnten einige Erkenntnisse über molekulare Regulierungsmechanismen des Rad54-Proteins herausgefunden werden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Nek1 beträchtlichen Einfluss auf die Regulierung von Rad54 während der HR ausübt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht untersucht wie Nek1 reguliert wird und in welchem Teil der Zelle Rad54 von Nek1 phosphoryliert wird. Diese Fragestellung soll in den nächsten drei Abschnitten dieser Arbeit diskutiert werden.

6.3.1 Lokale Rad54-Phosphorylierung am DNA-Schadensort

Rad54 bildet nach Bestrahlung Foci aus und ist folglich am DNA-Schaden lokalisiert. Da Rad54 am DNA-Schadensort binden kann, stellt sich die Frage, ob es dort auch von Nek1 phosphoryliert wird. Wenn diese Vermutung zutreffen würde, müsste die Interaktion von Nek1 und Rad54 bzw. die Rad54-Phosphorylierung einem regulierten Mechanismus unterliegen, um gewährleisten zu können, dass Rad54 ausschließlich zu späten Schritten der HR phosphoryliert wird. Eine solche Regulierung könnte z.B. durch die Bindung von Nek1 an HR-typische DNA-Strukturen erfolgen, um dort anschließend Rad54 zu phosphorylieren. Es wurde jedenfalls berichtet, dass Nek1 DSB-Reparatur-Foci ausbilden kann und somit am DNA-Schaden lokalisiert ist (Polci et al., 2004). Es war jedoch im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich dieses Resultat mittels einer Reihe von technischen Variationen, wie dem Einsatz verschiedenster spezifischer Nek1-Antikörper, GFP-Nek1-Konstrukten, Benutzung von Röntgenbestrahlung bzw. Mikro-Laserbestrahlung zu reproduzieren. Außerdem widersprechen weitere eigene Experimente einer Phosphorylierung von Rad54 am DNA-Schadensort. In diesen Experimenten wurde die Ausbildung von HR-Strukturen durch die Inhibition

von Rad51 oder von CtIP unterdrückt, sodass keine Nukleoproteinfilamente entstehen, an die Nek1 binden könnte. In diesem Versuchsansatz konnte keine Reduktion des pRad54-Levels detektiert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Rad54 unabhängig von der Ausbildung von HR-Strukturen phosphoryliert wird. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Phosphorylierung von Rad54 nicht durch Bindung von Nek1 an HR-typische DNA-Strukturen reguliert wird.

6.3.2 Globale Rad54-Phosphorylierung im Zellkern

Eine weitere Möglichkeit für den Ort der Phosphorylierung von Rad54 durch Nek1 könnte abseits vom DSB liegen. Diese Möglichkeit wird durch die extrem kurze Aufenthaltsdauer von Rad54 am DNA-Schaden wahrscheinlicher, was in dieser Arbeit durch FRAP-Experimente bestätigt wurde (Abbildung 5.9). So wurde ebenfalls in anderen FRAP-Studien gezeigt, dass ein Rad54-Molekül nur wenige Sekunden am DSB residiert bevor es durch ein anderes Rad54-Molekül ausgetauscht wird, während ein Rad51-Molekül erst nach mehreren Minuten Aufenthaltsdauer ersetzt wird (Agarwal et al., 2011; Essers et al., 2002). Durch die hohe Austauschrate von Rad54 könnte man sich also einen Mechanismus vorstellen, bei welchem Rad54 zu späten Zeiten global im Zellkern phosphoryliert wird, und über die Zeit zur Anreicherung von phosphoryliertem Rad54 am DNA-Schadensort führt. Eine Rad54-Phosphorylierung im gesamten Zellkern setzt allerdings eine gewisse Synchronität in der Entstehung von späten HR-Ereignissen voraus, denn es muss gewährleistet sein, dass Rad54 nicht zu früh phosphoryliert wird. Nun werden aber alle in der Zelle vorkommenden HR-spezifischen DSBs unterschiedlich schnell repariert. Dies könnte dazu führen, dass die globale Phosphorylierung von Rad54 im Zellkern stattfindet, während sich einzelne DSBs immer noch in frühen HR-Stadien befinden, was vermutlich unpassende Funktionen von Rad54 aktivieren würde. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Phosphorylierung von Rad54 erst zu einem gewissen Zeitpunkt einsetzt, wenn bereits alle HR-abhängigen DSBs ein fortgeschrittenes HR-Stadium erreicht haben. Nach einem solchen Modell müssten folglich schnell reparierende, HR-abhängige DSBs zum Zeitpunkt der maximalen Rad54-Phosphorylierung bereits repariert vorliegen, während sich langsam reparierende HR-Ereignisse in einem geeigneten HR-Stadium befinden, um von phosphoryliertem Rad54 zu profitieren. Diese Hypothese wird durch Betrachtung der DSB-Reparaturkinetik von Nek1-defizienten Zellen in der G2-Phase gestützt. Auf Rad51-Ebene ist zwischen 2 und 8 h ein leichter Rückgang der Rad51-Foci, also ein geringes Maß an DSB-Reparatur zu beobachten, welche durch schnell reparierende HR-Ereignisse erklärt werden könnte (Abbildung 5.4 C). Die späte Rad54-Phosphorylierung am Ser572 könnte folglich die HR ab einem gewissen Zeitpunkt beschleunigen, indem Rad51 aktiv durch Interaktion mit Rad54 von der DNA entfernt wird und somit Rekombinations-assoziierte DNA-Synthese stattfinden kann. Dieses Modell könnte gleichzeitig einen Mechanismus repräsentieren, der gewährleistet, dass die Reparatur von langsam reparierenden

HR-Ereignissen beschleunigt werden muss, um etwa den Eintritt von HR-Intermediaten in die Mitose zu vermeiden. Es ist bereits bekannt, dass Nek1 ebenfalls eine entscheidende Rolle für die zeitlichen Abläufe in der Mitose besitzt und damit für eine Art Feinjustierung während dieser Prozesse verantwortlich ist. Ist diese feine Abstimmung gestört, führt dies zum Verlust der genomischen Integrität und somit zur Aneuploidie der Zellen (Chen et al., 2011b). Es ist also möglich, dass Nek1 eine entscheidende Rolle für das *Timing* sowie die Kontrolle zwischen DSB-Reparatur und Zellzyklusarrest einnehmen könnte und die DSB-Reparatur von HR-Ereignissen zu einem entscheidenden Zeitpunkt beschleunigt. Desweiteren ist bekannt, dass Nek1 direkt nach Bestrahlung in den Zellkern transloziert (Hilton et al., 2009; Polci et al., 2004). Dieser Mechanismus könnte die beobachtete späte Phosphorylierung von Rad54 in der G2-Phase erklären (Abbildung 5.10 B). Die Zunahme von aktivem Nek1 im Zellkern könnte somit zu einer Zunahme von phosphoryliertem Rad54 führen, und zwar unabhängig von ausgebildeten HR-Strukturen.

6.3.3 Phosphorylierung von Rad54 an den Zentrosomen

Neben der Phosphorylierung von Rad54 im Zellkern könnte auch eine Phosphorylierung in einer anderen Zellorganelle denkbar sein. So ist bereits bekannt, dass Nek1 an den Zentrosomen bzw. an den *Basal Bodies* von Cilien lokalisiert ist und dort in die Aufrechterhaltung der Stabilität dieser Organellen involviert ist (Thiel et al., 2011; White and Quarmby, 2008). Zentrosomen sind unter anderem an wichtigen entwicklungsbiologischen Prozessen, der Zellzykluskontrolle sowie an der mitotischen Teilung beteiligt sind. Interessanter Weise sind die meisten bekannten DSB-Reparaturproteine des NHEJ sowie der HR ebenfalls an den Zentrosomen lokalisiert sind (Acu et al., 2010; Cappelli et al., 2011). Es wurden dort DNA-Reparaturproteine wie Mus81, Gen1, ATR, ATRIP, Chk1, Chk2, Rad51 und dessen Paraloge identifiziert (Shimada and Komatsu, 2009). Man geht davon aus, dass die Zentrosomen und die dort lokalisierten Proteine eine wichtige Rolle während der Regulation der DNA-Schadensantwort einnehmen und somit das Schicksal der Zelle beeinflussen können. So konnte beobachtet werden, dass in Abwesenheit von Rad51 eine Amplifikation der Zentrosomenanzahl auftritt, was auf eine Rad51-Funktion bei der zentrosomalen Organisation hindeutet (Cappelli et al., 2011). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung oder nach langanhaltendem Replikationsstress ebenfalls eine Amplifikation der Zentrosomenanzahl induziert wird, sodass stark beschädigte Zellen die nächste Mitose aufgrund von massiven Fehlteilungen nicht überleben (Löffler et al., 2006; Shimada and Komatsu, 2009).

Anhand dieser und weiterer Erkenntnisse geht man mittlerweile davon aus, dass die Zentrosomen eine Art Entstehungsort für Protein-Interaktionen darstellen könnten, welche dann Funktionen bei der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur einnehmen. So wurde z.B. gezeigt, dass der Kinasekomplex Cdk1-CyclinB an den Zentrosomen entsteht, und anschließend wichtige Prozesse bei

der mitotischen Teilung reguliert (Kramer et al., 2004). Da bislang kein exakter Aktivierungsmechanismus von Nek1 beschrieben ist und Nek1 an den Zentrosomen lokalisiert ist, wäre es ebenfalls denkbar, dass die Nek1-Kinaseaktivierung dort vermittelt wird. Es könnte desweiteren möglich sein, dass Rad54 an den Zentrosomen von Nek1 phosphoryliert wird. Diese Vermutung kann dadurch unterstützt werden, dass in eigenen vorläufigen Experimenten ebenfalls eine Lokalisierung von Rad54 an den Zentrosomen nachgewiesen wurde, sodass Nek1 mit Rad54 dort kolokalisiert. Phosphoryliertes Rad54 könnte dann in den Zellkern immigrieren und einen Komplex mit Rad51 formen. Es besteht somit möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von HR-Proteinen an den Zentrosomen und der Regulation der HR. Es ist jedenfalls davon auszugehen, dass Zentrosomen im Netzwerk der DNA-Schadensantwort einen bislang unterschätzten Beitrag leisten.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass Rad54 von Nek1 nicht am DSB phosphoryliert wird. Aufgrund der Nek1-Translokation in den Zellkern, könnte stattdessen eine globale Rad54-Phosphorylierung im gesamten Nukleus in Betracht gezogen werden. Desweiteren ist eine Nek1/Rad54-Interaktion und somit Rad54-Phosphorylierung an den Zentrosomen denkbar. Außerdem ist es vorstellbar, dass die zeitliche Kinetik der Rad54-Phosphorylierung im Zellkern aus zwei Komponenten besteht, welche durch eine Kombination von beiden Prozessen zustande kommt.

6.4 Einfluss von Nek1 und Rad54 auf verschiedene HR-Prozesse

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Nek1 bei der klassischen HR-abhängigen Reparatur von DSBs essentiell ist. Es stellt sich allerdings die Frage, ob Nek1 ebenfalls bei anderen HR-Prozessen wie bei der Stabilisierung von Replikationsgabeln in der S-Phase oder bei der Erzeugung von genetischen Variationen in der Meiose beteiligt ist. Desweiteren soll erörtert werden, ob eine mögliche Beteiligung von Nek1 an solchen Prozessen über eine Interaktion mit Rad54 stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Überlebensexperimente mit S-Phase-schädigenden Agenzien oder mittels Foci-Studien in der S-Phase bereits eine Beteiligung von Nek1 bei dem Reparaturprozess der HR von induzierten DSBs nachgewiesen werden (Abbildung 5.2 und 5.3). Es ist weiterhin bekannt, dass der Mechanismus der HR in der S-Phase, wie z.B. bei der Stabilisierung von Replikationsgabeln bzw. bei der Reparatur von DNA-Schäden nach der Kollabierung von Replikationsgabeln, eine wichtige Rolle spielt (Petermann et al., 2010). Kürzlich wurde interessanterweise gezeigt, dass das Nek-Familienmitglied Nek8 an Replikationsgabeln bindet und deren Stabilität reguliert (Choi et al., 2013). Nek8-defiziente Zellen weisen folglich eine erhöhte Anzahl von spontanen DSBs auf, welche durch endogenen Replikationsstress in der S-Phase entstehen

(Choi et al., 2013). Da in der vorliegenden Arbeit in Nek1-defizienten Zellen nach Replikationsstress ebenfalls eine stark erhöhte Anzahl von Chromatidbrüchen im Vergleich zu Kontrollzellen auftritt, kann vermutet werden, dass Nek1 bei HR-assoziierten Prozessen in der S-Phase ebenfalls involviert ist und eventuell wie Nek8 an der Replikationsgabel bindet (Abbildung 5.1). Diese Vermutung wird zusätzlich von dem Befund bestärkt, dass Nek1 in direkten Zusammenhang mit der Chromatinbeladung von Replikationsfaktoren gebracht wird (Patil et al., 2013). Es ist allerdings fraglich, ob solche Nek1-abhängigen Prozesse nach Replikationsstress über einen hochkonservierten Mechanismus in Interaktion mit Rad54 ablaufen, denn es ist bekannt, dass in der S-Phase sowohl Rad54-abhängige als auch Rad54-unabhängige HR-Prozesse während der Instandhaltung von Replikationsgabeln stattfinden (Eppink et al., 2011). So wurde z.B. gezeigt, dass DNA-*chickenfoot*-Strukturen durch Bindung von Rad51 stabilisiert und vor Degradation geschützt werden, während Rad54 an einem solchen Prozess nicht beteiligt ist (Schlacher et al., 2011).

Desweiteren ist bekannt, dass Nek1 in den *Testes* männlicher Mäuse im Vergleich zu anderen Geweben stark exprimiert vorliegt und bei der Spermatogenese involviert ist (Letwin et al., 1992). So weisen männliche Nek1-*Knock-Out* Mäuse stark verkleinerte Hoden auf und sind nicht in der Lage Spermatozyten zu bilden. Weiterhin ist für Nek1 eine spezifische Funktion in der Meiose beschrieben. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Kohesine in Nek1-defizienten meiotischen Zellen während der späten ProphaseI nicht effizient entfernt werden können (Holloway et al., 2011). Desweiteren wurde in diesem Zusammenhang eine Interaktion von Nek1 mit der Peptidylprolyl Cis-Trans-Isomerase FKBP6 nachgewiesen. In FKBP6-defizienten Zellen ist wiederum in der frühen ProphaseI eine normale Ausbildung von Rad51-Foci zu beobachten, während in der späten ProphaseI eine Akkumulation von Rad51-Foci bzw. DMC1-Foci zu detektieren ist (Crackower et al., 2003). Diese Beobachtung ist mit der Persistenz von Rad51-Foci in Nek1-defizienten Zellen nach Bestrahlung vergleichbar. In Anbetracht der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und der Tatsache, dass Nek1 in der Meiose eine Rolle spielt, ist es vorstellbar, dass Nek1 auch in der Meiose eine Funktion während der Rad51-Dissoziation besitzt. Da Rad54 bei HR-Prozessen zwischen Schwesterchromosomen eine untergeordnete Rolle spielt, ist anzunehmen, dass Nek1 in der Meiose nicht mit Rad54 interagiert (Dronkert et al., 2000). Bei einem solchen Prozess könnte allerdings Rad54B beteiligt sein, welches während der Meiose mit Rad51 bzw. mit dessen Paralog DMC1 interagiert (Sarai et al., 2006; Tanaka et al., 2000). So besitzt Rad54B das gleiche hochkonservierte Nek1-spezifische Phosphorylierungsmotiv wie sein Paralog Rad54, sodass Nek1 Rad54B in der Meiose phosphorylieren könnte. Es wäre lohnenswert diese Zusammenhänge zukünftig genauer zu untersuchen.

6.5 Nek1, Krebs und Krebstherapie

Nek1 ist in Vorgänge während der Entwicklung von Organismen involviert. In der vorliegenden Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass Nek1 eine weitere wichtige Rolle in der Erhaltung der genomischen Integrität in ausdifferenzierten Zellen spielt. Folglich führt eine Dysfunktion oder Deregulierung von Nek1 zum Verlust der genomischen Integrität und deshalb zur Tumorgenese. In einer Studie konnte durch die Sequenzierung mehrerer Krebszelllinien bestätigend gezeigt werden, dass Nek1 sowie andere Nek-Familienmitglieder in verschiedensten Tumoren oft mutiert vorliegen (Moniz et al., 2011). Zusätzlich wurde in einer weiteren Studie das Potential von Nek1 zur Tumorgenese untersucht und beobachtet, dass heterozygote Nek1^{+/-}-Mäuse circa 3 Mal häufiger spontane Tumore entwickeln als Nek1^{+/+}-Mäuse (Chen et al., 2011b). Da nun in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Beteiligung von Nek1 während der HR aufgedeckt wurde, kann man zukünftig besser verstehen, warum es zur Aneuploidie und Tumorgenese in Nek1-defizienten Zellen kommt.

Eventuell kann sogar in zukünftigen Studien der Befund dieser vorliegenden Arbeit therapeutisch genutzt werden. Krebszellen proliferieren sehr schnell und benötigen infolge dessen in der S-Phase und Mitose HR-Mechanismen. In der Krebstherapie ist es daher oftmals sinnvoll einen DSB-Reparaturweg wie die HR zu inhibieren, welcher in stark proliferierenden Zellen aktiv ist, nicht aber in stationären G1/G0-Zellen, wie sie typischerweise in ausdifferenzierten Geweben vorliegen (Willers et al., 2002). Desweiteren stellen Kinasen besonders potente Ziele zur Inhibition von Signalwegen im Vergleich zu anderen Proteinen dar, weil diese regulatorischen Proteine erstens zentrale Funktionen in der Signaltransduktion einnehmen und zweitens bereits sehr gut erforscht sind, wodurch gute Vorhersagen zu deren Inhibition möglich sind (Zhang et al., 2009). So wurden bereits Studien zur Inhibition der HR-involvierten Kinase Chk1 durchgeführt und beobachtet, dass deren Inhibition zur Sensitivierung und somit zum verstärkten Absterben von Krebszellen führt (Bryant et al., 2014; Thompson and Eastman, 2013). Es ist also vorstellbar, dass auch eine temporäre Inhibition von Nek1 im gesamten Organismus den stark proliferierenden Krebszellen am meisten schaden würde und somit Nek1 ein geeignetes therapeutisches Zielobjekt darstellt.

Die Herstellung von geeigneten Nek1-spezifischen Inhibitoren würde zudem erleichtert werden, da bereits Nek2 als therapeutische Zielstruktur zur Inhibition in einigen Studien untersucht wurde. Es können folglich bereits wertvolle Schlussfolgerungen zur Inhibition der hochkonservierten Kinasedomäne der Nek-Familie, inklusive Nek1, getroffen werden (Frett et al., 2014; Lee et al., 2014). Nek2 ist der bislang am besten untersuchte Repräsentant der Nek-Familie und liegt ebenfalls wie Nek1 in unterschiedlichen Tumoren mutiert oder dereguliert vor (Moniz et al., 2011). Jedoch ist keine explizite Funktion von Nek2 während der DNA-Schadensantwort bekannt (Meirelles et al., 2014). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Funktion von Nek1 während der HR eröffnet hingegen einen



spezifischen Anwendungsbereich für zukünftige therapeutische Ansätze, wie zum Beispiel die spezifische Nek1-Inhibition in Tumoren, welche von Homologer Rekombination profitieren.

7 Literaturverzeichnis

- Acu, I.D., Liu, T., Suino-Powell, K., Mooney, S.M., D'Assoro, A.B., Rowland, N., Muotri, A.R., Correa, R.G., Niu, Y., Kumar, R., et al. (2010). Coordination of centrosome homeostasis and DNA repair is intact in MCF-7 and disrupted in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 70, 3320–3328.
- Adelman, C.A., Lolo, R.L., Birkbak, N.J., Murina, O., Matsuzaki, K., Horejsi, Z., Parmar, K., Borel, V., Skehel, J.M., Stamp, G., et al. (2013). HELQ promotes RAD51 paralogue-dependent repair to avert germ cell loss and tumorigenesis. *Nature* 502, 381–384.
- Agarwal, S., van Cappellen, W. a, Guénolé, A., Eppink, B., Linsen, S.E. V, Meijering, E., Houtsmuller, A., Kanaar, R., and Essers, J. (2011). ATP-dependent and independent functions of Rad54 in genome maintenance. *J. Cell Biol.* 192, 735–750.
- Alexeev, A., Mazin, A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Mol Biol* 10, 182–186.
- Amitani, I., Baskin, R.J., and Kowalczykowski, S.C. (2006). Visualization of Rad54, a Chromatin Remodeling Protein, Translocating on Single DNA Molecules. *Mol. Cell* 23, 143–148.
- Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (2014). Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro. *Cell* 157, 757–766.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* 173, 195–206.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A. a, Krempler, A., Jeggo, P. a, and Löbrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28, 3413–3427.
- Binz, S.K., Sheehan, A.M., and Wold, M.S. (2004). Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 3, 1015–1024.
- Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D., and Samama, J.-P. (1999). Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure* 7, 1505–1515.
- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 38, 1821–1831.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2007). RecQ helicases queuing with Srs2 to disrupt Rad51 filaments and suppress recombination. *Genes Dev.* 21, 3019–3026.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 297–308.
- Bryant, C., Scriven, K., and Massey, A.J. (2014). Inhibition of the checkpoint kinase Chk1 induces DNA damage and cell death in human Leukemia and Lymphoma cells. *Mol. Cancer* 13, 147.

-
- Bugreev, D. V, Mazina, O.M., and Mazin, A. V (2006). Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. *Nature* 442, 590–593.
- Bugreev, D. V, Hanaoka, F., and Mazin, A. V (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nat Struct Mol Biol* 14, 746–753.
- Bugreev, D. V, Rossi, M.J., and Mazin, A. V (2011). Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork. *Nucleic Acids Res.* 39, 2153–2164.
- Bugreev, D. V, Huang, F., Mazina, O.M., Pezza, R.J., Voloshin, O.N., Daniel Camerini-Otero, R., and Mazin, A. V (2014). HOP2-MND1 modulates RAD51 binding to nucleotides and DNA. *Nat Commun* 5.
- Burgess, R.C., Sebesta, M., Sisakova, A., Marini, V.P., Lisby, M., Damborsky, J., Klein, H., Rothstein, R., and Krejci, L. (2013). The PCNA Interaction Protein Box Sequence in Rad54 Is an Integral Part of Its ATPase Domain and Is Required for Efficient DNA Repair and Recombination. *PLoS One* 8, e82630.
- Cappelli, E., Townsend, S., Griffin, C., and Thacker, J. (2011). Homologous recombination proteins are associated with centrosomes and are required for mitotic stability. *Exp. Cell Res.* 317, 1203–1213.
- Carr, A.M., and Lambert, S. (2013). Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination. *J. Mol. Biol.* 425, 4733–4744.
- Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K.K., Venkitaraman, A.R., and Kowalczykowski, S.C. (2009). The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. *Cell* 136, 1032–1043.
- Ceballos, S.J., and Heyer, W.-D. (2011). Functions of the Snf2/Swi2 family Rad54 motor protein in homologous recombination. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1809, 509–523.
- Chanoux, R. a, Yin, B., Urtishak, K. a, Asare, A., Bassing, C.H., and Brown, E.J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J. Biol. Chem.* 284, 5994–6003.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 47, 497–510.
- Chen, Y., Chen, P.-L., Chen, C.-F., Jiang, X., and Riley, D.J. (2008). Never-in-mitosis related Kinase 1 functions in DNA damage response and checkpoint control. *Cc* 7, 3194–3201.
- Chen, Y., Craigen, W.J., and Riley, D.J. (2009). Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. *Cc* 8, 257–267.
- Chen, Y., Chen, C.-F., Riley, D.J., and Chen, P.-L. (2011a). Nek1 kinase functions in DNA damage response and checkpoint control through a pathway independent of ATM and ATR. *Cell Cycle* 10, 655–663.
- Chen, Y., Chen, C.-F., Chiang, H.-C., Pena, M., Polci, R., Wei, R.L., Edwards, R. a, Hansel, D.E., Chen, P.-L., and Riley, D.J. (2011b). Mutation of NIMA-related kinase 1 (NEK1) leads to chromosome instability. *Mol. Cancer* 10, 5.

-
- Chen, Y., Chen, C., Polci, R., Wei, R., Riley, D.J., and Chen, P. (2014). Increased Nek1 expression in Renal Cell Carcinoma cells is associated with decreased sensitivity to DNA-damaging treatment. *I.*
- Choi, H.J.C., Lin, J.-R., Vannier, J.-B., Slaats, G.G., Kile, A.C., Paulsen, R.D., Manning, D.K., Beier, D.R., Giles, R.H., Boulton, S.J., et al. (2013). NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. *Mol. Cell* *51*, 423–439.
- Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* *40*, 179–204.
- Clancy, S. (2008). DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nat. Educ. I.*
- Crackower, M.A., Kolas, N.K., Noguchi, J., Sarao, R., Kikuchi, K., Kaneko, H., Kobayashi, E., Kawai, Y., Kozieradzki, I., Landers, R., et al. (2003). Essential Role of Fkbp6 in Male Fertility and Homologous Chromosome Pairing in Meiosis. *Sci.* *300*, 1291–1295.
- Dronkert, M.L.G., Beverloo, H.B., Johnson, R.D., Hoeijmakers, J.H.J., Jasin, M., and Kanaar, R. (2000). Mouse RAD54 Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3147–3156.
- Ensminger, M., Iloff, L., Ebel, C., Nikolova, T., Kaina, B., and Löbrich, M. (2014). DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *J. Cell Biol.* *206*, 29–43.
- Eppink, B., Tafel, A.A., Hanada, K., van Drunen, E., Hickson, I.D., Essers, J., and Kanaar, R. (2011). The response of mammalian cells to UV-light reveals Rad54-dependent and independent pathways of homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* *10*, 1095–1105.
- Essers, J., Hendriks, R.W., Swagemakers, S.M., Troelstra, C., de Wit, J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* *89*, 195–204.
- Essers, J., Houtsmuller, A.B., van Veelen, L., Paulusma, C., Nigg, A.L., Pastink, A., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., and Kanaar, R. (2002). Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J.* *21*, 2030–2037.
- Feige, E., Shalom, O., Tsuril, S., Yissachar, N., and Motro, B. (2006). Nek1 shares structural and functional similarities with NIMA kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1763*, 272–281.
- Flott Youngho Pigli, Ying Zhang Rice, Phoebe A Sung, Patrick Jackson, Stephen P, S.K. (2011). Regulation of Rad51 function by phosphorylation. *EMBO Rep.* *12*, 833–839.
- Forget, A.L., and Kowalczykowski, S.C. (2012). Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature* *482*, 423–427.
- Frett, B., Brown, R. V, Ma, M., Hu, W., Han, H., and Li, H. (2014). Therapeutic Melting Pot of Never in Mitosis Gene A Related Kinase 2 (Nek2): A Perspective on Nek2 as an Oncology Target and Recent Advancements in Nek2 Small Molecule Inhibition. *J. Med. Chem.*
- Fung, C.W., Fortin, G.S., Peterson, S.E., and Symington, L.S. (2006). The rad51-K191R ATPase-Defective Mutant Is Impaired for Presynaptic Filament Formation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9544–9554.

-
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241–244.
- Van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H.J., and Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2, 196–206.
- Golub, E.I., Kovalenko, O. V, Gupta, R.C., Ward, D.C., and Radding, C.M. (1997). Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res.* 25 , 4106–4110.
- Henry-Mowatt, J., Jackson, D., Masson, J.-Y., Johnson, P.A., Clements, P.M., Benson, F.E., Thompson, L.H., Takeda, S., West, S.C., and Caldecott, K.W. (2003). XRCC3 and Rad51 Modulate Replication Fork Progression on Damaged Vertebrate Chromosomes. *Mol. Cell* 11, 1109–1117.
- Heyer, W.-D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X.-P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* 34 , 4115–4125.
- Heyer, W.-D., Ehmsen, K.T., and Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139.
- Hildebrandt, F., and Otto, E. (2005). Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nat Rev Genet* 6, 928–940.
- Hilton, L.K., White, M.C., and Quarmby, L.M. (2009). The NIMA-related kinase NEK1 cycles through the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 52–56.
- Holliday, R. (2007). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res. (Camb).* 89, 285–307.
- Holloway, K., Roberson, E.C., Corbett, K.L., Kolas, N.K., Nieves, E., and Cohen, P.E. (2011). NEK1 Facilitates Cohesin Removal during Mammalian Spermatogenesis. *Genes (Basel).* 2, 260–279.
- Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair. *J. Biol. Chem.* 284 , 9558–9565.
- Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357–361.
- Jackson, A.L., and Linsley, P.S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9, 57–67.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.-L., West, S.C., and Hickson, I.D. (2000). The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 , 6504–6508.
- Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev.* 24 , 1680–1694.
- Kiianitsa, K., Solinger, J.A., and Heyer, W. (2002). DNA replication repair and recombination: Rad54 Protein Exerts Diverse Modes of ATPase Activity on Duplex DNA Partially and Fully Covered with Rad51 Protein Rad54 Protein Exerts Diverse Modes of ATPase Activity on Duplex DNA Partially and Fully Covered.

Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev.* 26 , 1393–1408.

Kim, P.M., Paffett, K.S., Solinger, J. a, Heyer, W.-D., and Nickoloff, J. a (2002). Spontaneous and double-strand break-induced recombination, and gene conversion tract lengths, are differentially affected by overexpression of wild-type or ATPase-defective yeast Rad54. *Nucleic Acids Res.* 30, 2727–2735.

Kirshner, M., Rathavs, M., Nizan, A., Essers, J., Kanaar, R., Shiloh, Y., and Barzilai, A. (2009). Analysis of the relationships between ATM and the Rad54 paralogs involved in homologous recombination repair. *DNA Repair (Amst).* 8, 253–261.

Kramer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6, 884–891.

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818.

Kwon, Y., Chi, P., Roh, D.H., Klein, H., and Sung, P. (2007). Synergistic action of the *Saccharomyces cerevisiae* homologous recombination factors Rad54 and Rad51 in chromatin remodeling. *DNA Repair (Amst).* 6, 1496–1506.

De la Torre-Ruiz, M.-A., and Lowndes, N.F. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint is required for efficient repair of double strand breaks by non-homologous end joining. *FEBS Lett.* 467, 311–315.

Lanza, D.C.F., Meirelles, G. V., Alborghetti, M.R., Abrile, C.H., Lenz, G., and Kobarg, J. (2010). FEZ1 interacts with CLASP2 and NEK1 through coiled-coil regions and their cellular colocalization suggests centrosomal functions and regulation by PKC. *Mol. Cell. Biochem.* 338, 35–45.

Lee, Y.-S.E., Chuang, S.-H., Huang, L.Y.L., Lai, C.-L., Lin, Y.-H., Yang, J.-Y., Liu, C.-W., Yang, S., Lin, H.-S., Chang, C., et al. (2014). Discovery of 4-Aryl-N-arylcarbonyl-2-aminothiazoles as Hec1/Nek2 Inhibitors. Part I: Optimization of in Vitro Potencies and Pharmacokinetic Properties. *J. Med. Chem.* 57, 4098–4110.

Letwin, K., Mizzen, L., Motro, B., Ben-David, Y., Bernstein, a, and Pawson, T. (1992). A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J.* 11, 3521–3531.

Li, X., and Heyer, W.-D. (2009). RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 638–646.

Li, J., Holzschu, D.L., and Sugiyama, T. (2013). PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase δ , η , and ζ activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 , 7672–7677.

Li, X., Zhang, X.-P., Solinger, J.A., Kiianitsa, K., Yu, X., Egelman, E.H., and Heyer, W.-D. (2007). Rad51 and Rad54 ATPase activities are both required to modulate Rad51-dsDNA filament dynamics. *Nucleic Acids Res.* 35 , 4124–4140.

Li, X., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Heyer, W.-D. (2009). PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ . *Mol. Cell* 36, 704–713.

Liu, Y., and West, S.C. (2004). Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 937–944.

Liu, S., Ho, C.K., Ouyang, J., and Zou, L. (2013). Nek1 kinase associates with ATR-ATRIP and primes ATR for efficient DNA damage signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2175–2180.

Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 7, 861–869.

Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., and Jeggo, P.A. (2010). γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cc* 9, 662–669.

Löffler, H., Lukas, J., Bartek, J., and Krämer, A. (2006). Structure meets function--centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. *Exp. Cell Res.* 312, 2633–2640.

Longhese, M.P., Bonetti, D., Manfrini, N., and Clerici, M. (2010). Mechanisms and regulation of DNA end resection. *EMBO J.* 29, 2864–2874.

Lopez-Maury, L., Marguerat, S., and Bahler, J. (2008). Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* 9, 583–593.

Lydeard, J.R., Lipkin-Moore, Z., Sheu, Y.-J., Stillman, B., Burgers, P.M., and Haber, J.E. (2010). Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly. *Genes Dev.* 24, 1133–1144.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* 131, 887–900.

Makharashvili, N., Tubbs, A.T., Yang, S.-H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Lobrich, M., Sleckman, B.P., et al. (2014). Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection. *Mol. Cell* 54, 1022–1033.

Manning, G., Reiner, D.S., Lauwaet, T., Dacre, M., Smith, A., Zhai, Y., Svard, S., and Gillin, F.D. (2011). The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol.* 12, R66.

Matos, J., and West, S.C. (2014). Holliday junction resolution: Regulation in space and time. *DNA Repair (Amst)*. 19, 176–181.

Mazin, A. V, Alexeev, A.A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). A Novel Function of Rad54 Protein: Stabilization of the Rad51 Nucleoproteinfilament . *J. Biol. Chem.* 278, 14029–14036.

Mazin, A. V, Mazina, O.M., Bugreev, D. V, and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. 9, 286–302.

Mazina, O.M., and Mazin, A. V (2008). Human Rad54 protein stimulates human Mus81–Eme1 endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18249–18254.

Mazina, O.M., Rossi, M.J., Deakyne, J.S., Huang, F., and Mazin, A. V (2012). Polarity and Bypass of DNA Heterology during Branch Migration of Holliday Junctions by Human RAD54, BLM, and RECQ1 Proteins. *J. Biol. Chem.* 287 , 11820–11832.

Meirelles, G.V., Perez, A.M., de Souza, E.E., Basei, F.L., Papa, P.F., Melo Hanchuk, T.D., Cardoso, V.B., and Kobarg, J. (2014). “Stop Ne(c)king around”: How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World J. Biol. Chem.* 5, 141–160.

Mills, K.D., Ferguson, D.O., Essers, J., Eckersdorff, M., Kanaar, R., and Alt, F.W. (2004). Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. 1283–1292.

Mine-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol* 14, 510–517.

Moldovan, G.-L., Dejsuphong, D., Petalcorin, M.R., Hofmann, K., Takeda, S., Boulton, S., and D’Andrea, A. (2012). Inhibition of Homologous Recombination by the PCNA-Interacting Protein PARI. *Mol. Cell* 45, 75–86.

Moniz, L., Dutt, P., Haider, N., and Stambolic, V. (2011). Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. *Cell Div.* 6, 18.

Moura, D.J., Castilhos, B., Immich, B.F., Cañedo, A.D., Henriques, J. a P., Lenz, G., and Saffi, J. (2010). Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response. *Cell Cycle* 9, 2220–2229.

Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 196–207.

Nigg, E.A., and Raff, J.W. (2014). Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* 139, 663–678.

Nikolova, T., Ensminger, M., Löbrich, M., and Kaina, B. (2010). Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)*. 9, 1050–1063.

Nimonkar, A. V, Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 25 , 350–362.

Niu, H., Wan, L., Busygina, V., Kwon, Y., Allen, J.A., Li, X., Kunz, R.C., Kubota, K., Wang, B., Sung, P., et al. (2009). Regulation of Meiotic Recombination via Mek1-Mediated Rad54 Phosphorylation. *Mol. Cell* 36, 393–404.

Patil, M., Pabla, N., Ding, H.-F., and Dong, Z. (2013). Nek1 interacts with Ku80 to assist chromatin loading of replication factors and S-phase progression. *Cell Cycle* 12, 2608–2616.

Peacock-Villada, A., Yang, D., Danilowicz, C., Feinstein, E., Pollock, N., McShan, S., Coljee, V., and Prentiss, M. (2012). Complementary strand relocation may play vital roles in RecA-based homology recognition. *Nucleic Acids Res.* 40 , 10441–10451.

-
- Pelegrini, A.L., Moura, D.J., Brenner, B.L., Ledur, P.F., Maques, G.P., Henriques, J.A.P., Saffi, J., and Lenz, G. (2010). Nek1 silencing slows down DNA repair and blocks DNA damage-induced cell cycle arrest. *Mutagen.* 25 , 447–454.
- Perkins, J.R., Diboun, I., Dessailly, B.H., Lees, J.G., and Orengo, C. (2010). Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* 18, 1233–1243.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010). Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Mol. Cell* 37, 492–502.
- Peterson, S.E., Li, Y., Wu-Baer, F., Chait, B.T., Baer, R., Yan, H., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2013). Activation of DSB Processing Requires Phosphorylation of CtIP by ATR. *Mol. Cell* 49, 657–667.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S., and Obe, G. (2004). Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* 104, 7–13.
- Polci, R., Peng, A., Chen, P., Riley, D.J., and Chen, Y. (2004). NIMA-Related Protein Kinase 1 Is Involved Early in the Ionizing Radiation-Induced DNA Damage Response. 8800–8803.
- Popova, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Lebecqec, M., Takahashi, M., and Fleury, F. (2009). Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett.* 583, 1867–1872.
- Ragunathan Cheng Ha, Taekjip, K.L. (2012). RecA filament sliding on DNA facilitates homology search. *Elife* 1.
- Reeves, R., Langan, T.A., and Nissen, M.S. (1991). Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 , 1671–1675.
- Remus, D., Blanchette, M., Rio, D.C., and Botchan, M.R. (2005). CDK Phosphorylation Inhibits the DNA-binding and ATP-hydrolysis Activities of the Drosophila Origin Recognition Complex. *J. Biol. Chem.* 280 , 39740–39751.
- Renkawitz, J., Lademann, C.A., and Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 369–383.
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G.C.M., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., et al. (2004). A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci. *Mol. Cell* 16, 715–724.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 229–257.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. a, Unsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.

-
- Sarai, N., Kagawa, W., Kinebuchi, T., Kagawa, A., Tanaka, K., Miyagawa, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2006). Stimulation of Dmc1-mediated DNA strand exchange by the human Rad54B protein. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4429–4437.
- Sarai, N., Kagawa, W., Fujikawa, N., Saito, K., Hikiba, J., Tanaka, K., Miyagawa, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2008). Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. *Nucleic Acids Res.* *36*, 5441–5450.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. *Cell* *145*, 529–542.
- Shah, P.P., Zheng, X., Epshtein, A., Carey, J.N., Bishop, D.K., and Klein, H.L. (2010). Swi2/Snf2-related translocases prevent accumulation of toxic Rad51 complexes during mitotic growth. *Mol. Cell* *39*, 862–872.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., et al. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* *30*, 1079–1092.
- Shimada, M., and Komatsu, K. (2009). Emerging Connection Between Centrosome and DNA Repair Machinery. *J. Radiat. Res.* *50*, 295–301.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2014). Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. *Mol. Cell* *53*, 547–558.
- Shulman, M.J., Nissen, L., and Collins, C. (1990). Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4466–4472.
- Sneeden, J.L., Grossi, S.M., Tappin, I., Hurwitz, J., and Heyer, W.-D. (2013). Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4913–4925.
- Solinger, J. a, Kiianitsa, K., and Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol. Cell* *10*, 1175–1188.
- Sørensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuåsen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.* *7*, 195–201.
- De Souza, C.P., Horn, K.P., Masker, K., and Osmani, S.A. (2003). The SONB(NUP98) nucleoporin interacts with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* *165*, 1071–1081.
- Srivastava, V., Modi, P., Tripathi, V., Mudgal, R., De, S., and Sengupta, S. (2009). BLM helicase stimulates the ATPase and chromatin-remodeling activities of RAD54. *J. Cell Sci.* *122*, 3093–3103.
- Stead, B.E., Brandl, C.J., and Davey, M.J. (2011). Phosphorylation of Mcm2 modulates Mcm2–7 activity and affects the cell’s response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *39*, 6998–7008.

Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J.E. (2003). In Vivo Roles of Rad52, Rad54, and Rad55 Proteins in Rad51-Mediated Recombination. *Mol. Cell* 12, 209–219.

Surpili, M.J., Delben, T.M., and Kobarg, J. (2003). Identification of Proteins That Interact with the Central Coiled-Coil Region of the Human Protein Kinase NEK1†. *Biochemistry* 42, 15369–15376.

Swagemakers, S.M.A., Essers, J., de Wit, J., Hoeijmakers, J.H.J., and Kanaar, R. (1998). The Human Rad54 Recombinational DNA Repair Protein Is a Double-stranded DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.* 273 , 28292–28297.

Symington, L.S., and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* 45, 247–271.

Tan, T.L.R., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S.M.A., de Wit, J., Benson, F.E., Hoeijmakers, J.H.J., and Kanaar, R. (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr. Biol.* 9, 325–328.

Tanaka, K., Hiramoto, T., Fukuda, T., and Miyagawa, K. (2000). A novel human rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51. *J. Biol. Chem.* 275, 26316–26321.

Terasawa, M., Ogawa, H., Tsukamoto, Y., Shinohara, M., Shirahige, K., Kleckner, N., and Ogawa, T. (2007). Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 , 5965–5970.

Thiel, C., Kessler, K., Giessler, A., Dimmler, A., Shalev, S. a., Von Der Haar, S., Zenker, M., Zahnleiter, D., St??ss, H., Beinder, E., et al. (2011). NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 106–114.

Thomä, N.H., Czyzewski, B.K., Alexeev, A. a, Mazin, A. V, Kowalczykowski, S.C., and Pavletich, N.P. (2005). Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 350–356.

Thompson, R., and Eastman, A. (2013). The cancer therapeutic potential of Chk1 inhibitors: how mechanistic studies impact on clinical trial design. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76, 358–369.

Ting, N.S.Y., and Lee, W.-H. (2004). The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst).* 3, 935–944.

Trickey, M., Grimaldi, M., and Yamano, H. (2008). The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Controls Repair and Recombination by Ubiquitylating Rhp54 in Fission Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 28 , 3905–3916.

Tripathi, V., Nagarjuna, T., and Sengupta, S. (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J. Cell Biol.* 178, 9–14.

Upadhy, P., Birkenmeier, E.H., Birkenmeier, C.S., and Barker, J.E. (2000). Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 217–221.

Wang, X., Ira, G., Tercero, J.A., Holmes, A.M., Diffley, J.F.X., and Haber, J.E. (2004). Role of DNA Replication Proteins in Double-Strand Break-Induced Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 24 , 6891–6899.

Ward, J.D., Muzzini, D.M., Petalcorin, M.I.R., Martinez-Perez, E., Martin, J.S., Plevani, P., Cassata, G., Marini, F., and Boulton, S.J. (2010). Overlapping Mechanisms Promote Postsynaptic RAD-51 Filament Disassembly during Meiotic Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* 37, 259–272.

Wesoly, J., Agarwal, S., Sigurdsson, S., Komen, S. Van, Qin, J., Steeg, H. Van, Benthem, J. Van, Wassenaar, E., Baarends, W.M., Ghazvini, M., et al. (2006). Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination , DNA Damage Repair , and Meiosis Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination , DNA Damage Repair , and Meiosis †.

White, M.C., and Quarmby, L.M. (2008). The NIMA-family kinase, Nek1 affects the stability of centrosomes and ciliogenesis. *BMC Cell Biol.* 9, 29.

Willers, H., Xia, F., and Powell, S.N. (2002). Recombinational DNA Repair in Cancer and Normal Cells: The Challenge of Functional Analysis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2, 86–93.

Wolner, B., Komen, S. Van, Sung, P., Peterson, C.L., and Antonio, S. (2003). Recruitment of the Recombinational Repair Machinery to a DNA Double-Strand Break in Yeast Science Center at San Antonio. 12, 221–232.

Wright, W.D., and Heyer, W.-D. (2014). Rad54 Functions as a Heteroduplex DNA Pump Modulated by Its DNA Substrates and Rad51 during D Loop Formation. *Mol. Cell* 53, 420–432.

Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426, 870–874.

Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thomä, N.H., Zheng, N., Chen, P.-L., Lee, W.-H., and Pavletich, N.P. (2002). BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure. *Sci.* 297 , 1837–1848.

Yoder, B.K. (2007). Role of Primary Cilia in the Pathogenesis of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 , 1381–1388.

Yuan, Z.-M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R., et al. (1998). Regulation of Rad51 Function by c-Abl in Response to DNA Damage. *J. Biol. Chem.* 273 , 3799–3802.

Zhang, J. (2013). The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Biosci.* 3, 11.

Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9, 28–39.

Zhang, Z., Fan, H.-Y., Goldman, J. a, and Kingston, R.E. (2007). Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 397–405.

Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2014). Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell* 134, 981–994.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Name: Julian Spies
Geburtstag: 01.05.1984
Geburtsort: Aschaffenburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion:

06/2011 – 09/2014 Technische Universität Darmstadt
Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Löbrich

Studium:

10/2005 – 05/2011 Technische Universität Darmstadt
Studiengang Biologie mit Schwerpunkt
Biochemie, Pflanzenphysiologie und Zellbiologie
Abschluss: Diplom 1,0

Auslandssemester:

06/2010 – 01/2011 University of Stellenbosch, South Africa
Institute of Wine Biotechnology

Auszeichnungen:

07/2011 Preis für die beste Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der
Technische Universität Darmstadt
10/2013 Posterpreis, 16. Jahrestagung der Gesellschaft für biologische
Strahlenforschung

Zivildienst:

09/2004 – 5/2005 Comenius Schule Aschaffenburg
Schule für geistig- und körperlich-behinderte Kinder

Schulische Bildung:

09/1995 – 06/2004 Friedrich-Dessauer Gymnasium Aschaffenburg
Abschluss: Abitur 2,4

8.2 Tagungsbeiträge

13th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Ermatingen Schweiz, 06/2013, Nek1 phosphorylates Rad54 to promote homologous recombination repair (Poster)
JULIAN SPIES, OLIVIA BARTON, STEFFEN NAUMANN, CHRISTIAN THIEL, MARKUS LÖBRICH

16th Jahrestagung der GBS, Gesellschaft für biologische Strahlenforschung, Darmstadt 09/2013, Nek1 phosphorylates Rad54 to promote homologous recombination repair (Poster)
JULIAN SPIES, OLIVIA BARTON, STEFFEN NAUMANN, CHRISTIAN THIEL, MARKUS LÖBRICH

Mechanisms of Recombination: 50th Anniversary Meeting of the Holliday Model, Alicante Spanien, 05/2014, Nek1 phosphorylates Rad54 to promote homologous recombination repair (Poster)
JULIAN SPIES, OLIVIA BARTON, STEFFEN NAUMANN, JESSICA SNEEDEN, CHRISTIAN THIEL, WOLF-DIETRICH HEYER, MARKUS LÖBRICH

8.3 Eigenbeiträge und Fremdbeiträge

Alle Experimente wurden von Julian Spies durchgeführt, außer dem Experiment zu Abbildung 5.8 A. Dieses Experiment wurde unter der Leitung von Julian Spies im Rahmen der Bachelorarbeit von Michael Sürder am Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt.

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Desweiteren möchte ich mich herzlich für die Förderung und die gute Zusammenarbeit über die letzten Jahre hinweg bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Christina Cardoso möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Ko-Referats und ebenso für die gute Kommunikation und Diskussionsbereitschaft während der letzten drei Jahre bedanken.

Innerhalb dieser Arbeit ist wohl ein relativ umfangreiches Methodenspektrum zustande gekommen. Die Anwendungen all dieser Methoden wurden nur durch die Unterstützung von verschiedenen Kollegen möglich. In erster Linie möchte ich mich bei jedem einzelnen Mitarbeiter der AG Löbrich für hilfreiche Anmerkungen sowie für Hilfestellungen bei der Umsetzung von verschiedenen Methoden bedanken. Besonders hervorheben möchte ich allerdings die Unterstützung von Prof. Dr. Franz Rödel bei der Etablierung von Ko-Immunpräzipitationen. Ebenso konnte ich bei der Planung und Durchführung der FRAP-Experimente von der Expertise von Dr. Burkhardt Jakob und Dr. Alexander Rapp profitieren.

Desweiteren möchte ich meinen Dank bei Anja Waizenegger, Ratna Nuria Weimer, und Dr. Michael Ensminger zum Ausdruck bringen. Ich danke Euch vielmals für Eure Mithilfe sowie für kreative Anmerkungen bei der Korrektur dieser Arbeit. Herzlich danken möchte ich vor allem auch Dr. Olivia Barton für die intensive Zusammenarbeit in den letzten Jahren und natürlich auch während des Endspurts dieser Arbeit - Danke für das Korrekturlesen.

Ich möchte mich allerdings nicht nur für die gute professionelle Zusammenarbeit bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Löbrich bedanken, sondern vor allem für die schönen und lustigen Momente die wir zusammen erlebt haben.

Das größte Dankeschön gilt natürlich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin. Ihr habt mich unentwegt unterstützt und gefördert. Dafür bin ich Euch sehr dankbar.